



การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Salmonella* ที่ก่อโรคในสุกร



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *Salmonella* ที่ก่อโรค
ในสุกร



โดย
นางสาวภัทราพร ศรีประสงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES SPECIFIC TO
SALMONELLA, PATHOGENIC BACTERIA IN SWINE



By

MISS Pattaraporn SRIPRASONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2022
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะ ต่อ <i>Salmonella</i> ที่ก่อโรคในสุกร
โดย	นางสาวภัทราพร ศรีประสงค์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 1 ระดับปริญญาโท
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. ชลเทพ อูสาคุ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

	คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย (ผู้รักษาการแทน)
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สาธิต นิรัติศัย)	
พิจารณาเห็นชอบโดย	ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ)	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท)	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. ชลเทพ อูสาคุ)	ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(สัตวแพทย์หญิง ดร. ยลยง วัณวงษ์)	

620920015 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : ซัลโมเนลลา คอลเลอร่าซูอิส, แบคทีเรียโอเฟจ, สารควบคุมทางชีวภาพ, สุกร

นางสาว ภัทรพร ศรีประสงค์: การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *Salmonella* ที่ก่อโรคในสุกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท

Salmonella Choleraesuis เป็นซีโรไทป์ที่พบได้ทั่วไปซึ่งเป็นสาเหตุของโรคซัลโมเนลโลซิสในสุกร นอกจากนี้ ยังพบการดื้อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลาในฟาร์มสุกรอีกด้วย ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา การศึกษาการใช้แบคทีเรียโอเฟจชี้ให้เห็นว่าวิธีการนี้มีแนวโน้มที่มีศักยภาพสูงสำหรับการควบคุมทางชีวภาพ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ที่เกี่ยวข้องกับ การติดเชื้อในสุกร ตลอดจนประเมินประสิทธิภาพของเฟจต่อการฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสถานะของเหลวลำไส้จำลอง (simulated intestinal fluid, SIF) ในการศึกษา นี้ แยกเฟจได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลทจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และน้ำทิ้งจากท่อระบายน้ำของโรงฆ่าสัตว์ เฟจส่วนใหญ่สามารถติดเชื้อซัลโมเนลลาได้ 4 สายพันธุ์ โดยเฟจ vB_SCh-RP5i3B และ vB_SCh-RP61i4 มีประสิทธิภาพสูงในการติดเชื้อ *S. Choleraesuis* และ *S. Rissen* เฟจทุก ไอโซเลทเสถียรที่อุณหภูมิ 4–45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นของเฟจลดลงเมื่อ อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เฟจส่วนใหญ่ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ที่ pH ต่ำ (pH 2.5–4.0) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงในสถานะของเหลวกระเพาะอาหารจำลอง (simulated gastric fluid, SGF) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ เฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า เฟจทั้งหมดมีหัวที่มีลักษณะหลายเหลี่ยมแบบ สมมาตร (icosahedral symmetry) และมีหางโดยเฟจ 3 ไอโซเลท มีลักษณะหางสั้น ไม่สามารถยึดหดได้ ในขณะที่ อีก 6 ไอโซเลท มีลักษณะหางยาว และไม่สามารถยึดหดได้ ในขณะเดียวกัน การศึกษาจีโนมของเฟจด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) สามารถจัดกลุ่มเฟจเบื้องต้นได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม อย่างไรก็ตามเฟจที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และมีประสิทธิภาพทำลายเชื้อที่แตกต่างกัน ดังนั้นอาจจัดเป็นเฟจคนละชนิดกัน การศึกษาประสิทธิภาพของเฟจต่อการฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ใน SIF ที่ MOI 1 และ 10 พบว่า เฟจเดี่ยว และเฟจผสม (เฟจสามชนิด) มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *S. Choleraesuis* ใน SIF และการบำบัดด้วยเฟจที่ MOI 10 แสดงการลดปริมาณเชื้อได้เร็วกว่า MOI 1 และเฟจผสมมีประสิทธิภาพมากกว่า เฟจเดี่ยว จากผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า เฟจที่แยกได้นี้อาจเป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสำหรับ ฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสุกร และการนำเฟจไปใช้ในสัตว์อาจผ่านการให้ทางปากได้ อย่างไรก็ตาม ควร ทำการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ (*in vivo*)

620920015 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Bacteriophage, Biocontrol, Salmonella Choleraesuis, Swine

MISS PATTARAPORN SRIPRASONG : SELECTION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES SPECIFIC TO *SALMONELLA*, PATHOGENIC BACTERIA IN SWINE THESIS
ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR RUJIKAN NASANIT, Ph.D.

Salmonella Choleraesuis is the most common serotype in swine that causes salmonellosis. Furthermore, antibiotic-resistant *Salmonella* has been discovered on swine farms. In the last few years, bacteriophages have increasingly been used as a potential biocontrol strategy. Therefore, the objectives of this study were to isolate and characterize the bacteriophages that were specific to *S. Choleraesuis* strains associated with swine infection. Additionally, the efficacy of phage treatment against *S. Choleraesuis* strains in simulated intestinal fluid (SIF) was also evaluated. In this study, nine phages were isolated from natural water sources and drained liquid from a slaughterhouse. Most of them were capable of infecting four *Salmonella* strains. Phages vB_SCh-RP5i3B and vB_SCh-RP6i14 had a high efficiency in infecting *S. Choleraesuis* and *S. Rissen*. All phages remained stable for 1 hour at temperatures ranging from 4 to 45 °C. However, their viability decreased when the temperature was raised to 65 °C. Furthermore, most phages survived for 2 hours in simulated gastric fluid (SGF) at low pH (pH 2.5–4.0). Transmission electron microscopy (TEM) revealed that all phages had a symmetric icosahedral head and a tail. Three phage isolates had a short non-contractile tail, while the other six phages had a long non-contractile tail. Meanwhile, the phage genome analysis using the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technique could preliminarily cluster phages into 5 groups. However, the phages that were clustered together into the same group had distinct morphology and effectiveness against other strains. The study of phage efficacy against *S. Choleraesuis* in SIF at MOI 1 and 10 revealed that both individual phages and a phage cocktail (a combination of 3 phages) effectively reduced *S. Choleraesuis* in SIF. Phage treatments at MOI 10 started to decrease the number of bacterial cells earlier than those at MOI 1. Additionally, the phage cocktail outperformed individual phages. These findings indicate that the newly isolated phages could be a promising biocontrol agents against *S. Choleraesuis* infection in pigs and could be used via oral administration. Nevertheless, further *in vivo* studies are necessary.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้โอกาสและทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ตามเป้าหมาย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำเป็นอย่างดีที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ตลอดจนช่วยในการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดการทำวิจัย รวมถึงตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยตระหนักถึงความทุ่มเท และความเอาใจใส่อย่างดียิ่งของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ชลเทพ อุสาคุ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนช่วยปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์ และสัตวแพทย์หญิง ดร. ยลยง วัณวงษ์ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบ ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมสำหรับการแก้ไขและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา และขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่อำนวยความสะดวกทั้งสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่าง ๆ ในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยดำเนินได้อย่างสะดวก และสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณทิพากรณ์ ททรัพย์สมบูรณ์ คุณประไพ บางเขย และคุณนุชนาฏ เลี้ยงอำนวย เจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณวัลพิไล ยอดยิ่งทวีลาภ และคุณศิลา ศรียา ที่ช่วยอำนวยความสะดวกติดต่อประสานงานในการดำเนินการยื่นคำร้องต่าง ๆ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณปิยนันท์ ถนนอมชาติ ที่ช่วยแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาวนภาพัชญ์ อัมกลิ่น เพื่อนที่คอยเคียงข้างกันมาตลอด คอยช่วยเหลืองานต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นทางด้านเทคนิคต่าง ๆ ในการทำวิจัย หรือร่วมเดินทางไปสถานที่ทำวิจัยต่าง ๆ คอยให้คำปรึกษา ร่วมทุกข์ร่วมสุข และร่วมฝ่าฟันอุปสรรคต่าง ๆ จนสามารถทำงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาวโสภิต ใจบางยาง พี่ที่แสนดีและใจดี คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา สร้างความสนุกสนานในห้องปฏิบัติงานวิจัย ร่วมทุกข์ร่วมสุข และคอยให้กำลังใจข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบคุณ น้อง ๆ ในรุ่นป.โททุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจซึ่งกันและกัน และร่วมฝ่าฟันอุปสรรคต่าง ๆ จนสามารถผ่านอุปสรรคต่าง ๆ มาได้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความสนับสนุนการศึกษามาโดยตลอด และแรงผลักดันต่าง ๆ ที่ทำให้ผู้วิจัยมีกำลังใจศึกษาสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณน้องสาว ที่คอยสร้างรอยยิ้ม เสียงหัวเราะ และคอยให้กำลังใจเสมอมา



นางสาว ภัทราพร ศรีประสงค์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉุ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ลักษณะทั่วไปของซัลโมเนลลา และการก่อโรคในสุกร	5
2.2 การแพร่กระจายของซัลโมเนลลาในสุกร.....	6
2.3 การปนเปื้อนซัลโมเนลลาในสุกร และผลิตภัณฑ์จากสุกร	7
2.4 การดื้อสารต้านจุลชีพของซัลโมเนลลาในสุกร	9
2.5 แบคทีเรียโอเฟจ (Bacteriophage).....	12
2.5.1 วงจรชีวิตของแบคทีเรียโอเฟจภายในเซลล์แบคทีเรีย	13
2.5.2 โครงสร้างของแบคทีเรียโอเฟจ	14
2.5.3 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจ	15
2.5.3.1 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจในสุกร.....	16

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	20
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	21
3.3 วิธีการทดลอง	22
3.3.1 แบคทีเรีย แบคทีเรียโอฟาจ และสมภาวะการเพาะเลี้ยง.....	22
3.3.2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลา ด้วยวิธี disk diffusion	22
3.3.3 การคัดกรองแบคทีเรียโอฟาจในห้องปฏิบัติการที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i>	23
3.3.3.1 การตรวจหาแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i> ด้วยวิธี Spot test.....	23
3.3.3.2 การตรวจสอบแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i> ด้วยวิธี double layer agar.....	24
3.3.4 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอฟาจ.....	24
3.3.5 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอฟาจ	24
3.3.6 การคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i> จากตัวอย่างน้ำ.....	24
3.3.7 ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i>	25
3.3.7.1 การศึกษาช่วงของเซลล์เจ้าบ้านของแบคทีเรียโอฟาจ (host range test)	25
3.3.7.2 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอฟาจสำหรับทำลายซัลโมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ (efficiency of plating, EOP)	25
3.3.7.3 ศึกษาความเสถียรของแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i> ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	25
3.3.7.4 ศึกษาความเสถียรของแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i> ที่ pH ต่ำ ในสมภาวะของเหลวกระเพาะอาหารจำลอง (simulated gastric fluid, SGF).....	26
3.3.7.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM).....	26

3.3.8	ศึกษาจีโนมแบคทีเรียโอเฟจด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	26
3.3.9	ศึกษาประสิทธิภาพของเฟจต่อการฆ่าเชื้อ <i>S. Choleraesuis</i> ในสถานะของเหลวลำไส้จำลอง (simulated intestinal fluid, SIF)	27
3.3.10	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	28
บทที่ 4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	29
4.1	ความไวต่อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลา.....	29
4.2	ผลคัดกรองแบคทีเรียโอเฟจที่มีในห้องปฏิบัติการที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i>	30
4.3	ผลคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i> จากตัวอย่างน้ำ.....	35
4.4	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจสำหรับทำลายซัลโมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ (efficiency of plating, EOP).....	39
4.5	ความเสถียรของแบคทีเรียโอเฟจที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	41
4.6	ความเสถียรของแบคทีเรียโอเฟจที่ pH ต่ำ ในสถานะของเหลวกระเพาะอาหารจำลอง (simulated gastric fluid, SGF).....	43
4.7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ.....	45
4.8	ผลศึกษาจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	47
4.9	ประสิทธิภาพของเฟจต่อการฆ่าเชื้อ <i>S. Choleraesuis</i> ในสถานะของเหลวลำไส้จำลอง (simulated intestinal fluid, SIF).....	49
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	51
	สรุปผลการวิจัย.....	54
	ข้อเสนอแนะ	55
	รายการอ้างอิง	57
	ภาคผนวก.....	71
	ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	72

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี 74

ประวัติผู้เขียน..... 77



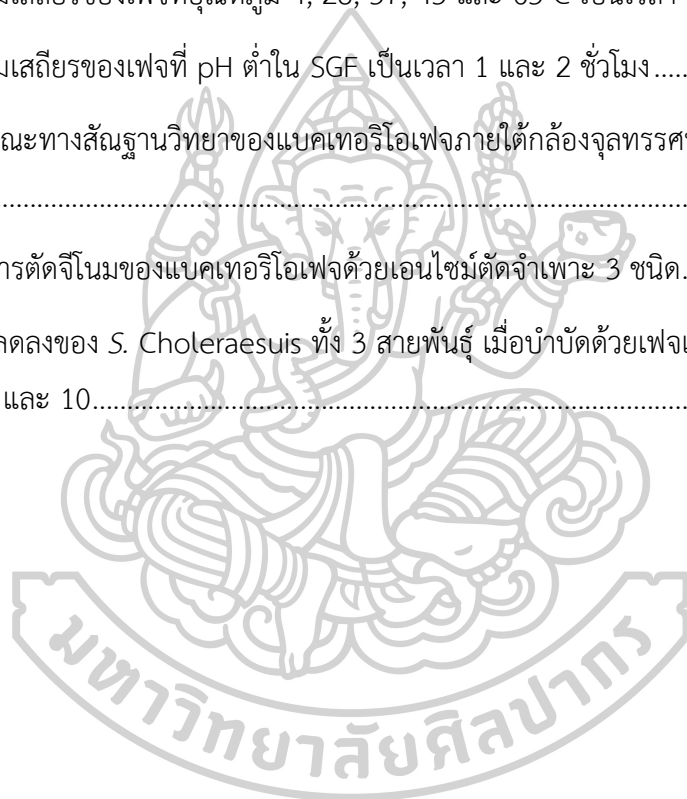
สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....	23
ตารางที่ 2 ผลทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลา.....	29
ตารางที่ 3 ช่วงของเซลล์เจ้าบ้าน (host range) และประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจในการเข้าทำลาย (EOP) ซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่น	31
ตารางที่ 4 แบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ <i>S. Choleraesuis</i> และลักษณะของพลาซมิดที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ.....	36
ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจในการเข้าทำลาย (EOP) ซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่น	40
ตารางที่ 6 แสดงขนาดหัวและหางของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 9 ไอโซเลท.....	45



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของแบคทีเรียโอฟาจ	14
ภาพที่ 2 โครงสร้างทั่วไปของเฟจโดยเน้นบริเวณหาง และความสามารถในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านโดยเจาะผนังเซลล์.....	15
ภาพที่ 3 ความเสถียรของเฟจที่อุณหภูมิ 4, 28, 37, 45 และ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	42
ภาพที่ 4 ความเสถียรของเฟจที่ pH ต่ำใน SGF เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง.....	44
ภาพที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM).....	46
ภาพที่ 6 ผลการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอฟาจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด.....	48
ภาพที่ 7 การลดลงของ <i>S. Choleraesuis</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อบำบัดด้วยเฟจเดี่ยว และเฟจผสม ใน SIF ที่ MOI 1 และ 10.....	50



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุบัติการณ์การเจ็บป่วยที่เกิดจากการบริโภคอาหาร (Foodborne illnesses outbreak) ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ยังคงสูงในทุกภูมิภาคทั่วโลก ซึ่งมีรายงานในปี 2020 พบผู้ป่วยจากการบริโภคอาหารมากถึง 600 ล้านราย และเสียชีวิต 420,000 ราย ทั่วโลก [1] ซัลโมเนลลาเป็นหนึ่งในเชื้อแบคทีเรียที่พบการแพร่ระบาดสูงและก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ มีรายงานของหน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority; EFSA) และศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งสหภาพยุโรป (European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC) ได้รวบรวมข้อมูลจาก 22 ประเทศของสมาชิกสหภาพยุโรป (EU) ในปี 2020 ได้นำเสนอ กรณีการระบาดของซัลโมเนลลาในมนุษย์ที่เกิดจากการอาหาร 694 ราย โดยเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหาร จำนวน 3,686 ราย รักษาในโรงพยาบาล จำนวน 812 ราย และเสียชีวิต จำนวน 7 ราย [2] ซัลโมเนลลาสามารถอาศัยในระบบทางเดินอาหาร และถูกขับออกมาทางอุจจาระ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามในอาหารดิบที่มาจากสัตว์ในระหว่างการผลิต และหลังการฆ่า [3] ซัลโมเนลลาเป็นเชื้อก่อโรคที่มีการรายงานอย่างกว้างขวางซึ่งเป็นสาเหตุติดเชื้อในสุกร อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อผลผลิตของอุตสาหกรรมสุกรทั่วโลก [4] สุกรสามารถติดเชื้อซัลโมเนลลาได้ในระหว่างการขนส่งไปยังโรงฆ่าสัตว์ หรือสภาพแวดล้อมในโรงฆ่าสัตว์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลากหลายปัจจัย เช่น ความเครียดของสุกรในระหว่างขนส่ง และการปนเปื้อนเชื้อในสิ่งแวดล้อม [5] ซัลโมเนลลาที่ก่อโรคในสุกร สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม โดยแบ่งตามช่วงโฮสต์ และลักษณะอาการทางคลินิก กลุ่มแรก คือ *Salmonella Choleraesuis* เป็นซีโรวารที่สามารถปรับตัวเข้ากับชนิดของโฮสต์ได้ (Host-adapted serovars) และเป็นที่น่าทึ่งกันว่า หากติดเชื้อจะส่งผลกระทบต่อระบบทั่วไปของร่างกาย ส่วนกลุ่มที่สอง คือ ซัลโมเนลลา ซีโรวารอื่น ๆ เช่น *S. Typhimurium* กลุ่มนี้จะมีช่วงโฮสต์ที่กว้างขึ้น และมีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบชั่วคราว (enteritis) [6] นอกจากนี้ มีรายงานการปนเปื้อนซัลโมเนลลาจากแหล่งต่าง ๆ เช่น ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ เนื้อหมูดิบ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมู ซากสุกร และโรงฆ่าสัตว์ [7-10] *S. Choleraesuis* เป็นซีโรวารที่พบได้บ่อยที่สุดในสุกร [11] ในสหรัฐอเมริกา มีรายงานการติดเชื้อ *S. Choleraesuis* มากกว่า 90% กรณีของโรคซัลโมเนลโลซิส (salmonellosis) ในสุกร นอกจากนี้ สุกรที่ติดเชื้อ *S. Choleraesuis* อาจส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม อาหาร หรือแหล่งน้ำ ซึ่งสามารถส่งผลให้เกิดการติดเชื้อ

S. Choleraesuis ในมนุษย์ [12] การติดเชื้อ *S. Choleraesuis* ของมนุษย์ ก่อให้เกิดความเจ็บป่วยต่อระบบทั่วไปของร่างกายที่รุนแรง และอาจเกิดการติดเชื้อนอกลำไส้ ซึ่งมีอัตราการเสียชีวิตสูง [13, 14] โดยปกติซีโรวาร *Choleraesuis* มักเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะโลหิตเป็นพิษในสุกร ซึ่งอาจมีลักษณะเฉพาะคือ ตับอักเสบ (hepatitis) ปอดบวม (pneumonia) และหลอดเลือดในสมองอักเสบ (cerebral vasculitis) [15] โดยทั่วไป *S. Choleraesuis* มีความสามารถในการก่อโรคได้ทั้งในสุกรวัยเด็ก ที่มีช่วงอายุ 3-5 สัปดาห์ และสุกรที่อายุมากที่มีน้ำหนักมากกว่า 120 ปอนด์ [16] อย่างไรก็ตาม เชื้อมีแนวโน้มที่จะก่อโรคในสุกรวัยเด็กมากกว่าในสุกรที่อายุมาก [17]

ยาปฏิชีวนะถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมสุกร เพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ป้องกันการติดเชื้อ และเพื่อรักษาการติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม การใช้ยาปฏิชีวนะในทางที่ผิดและมากเกินไปอาจทำให้เชื้อเกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ เชื้อดื้อยาสามารถอยู่รอดและแพร่กระจายยีนดื้อยาในสิ่งแวดล้อมได้อย่างกว้างขวาง [18] ทั้งนี้ มีรายงานจำนวนมากพบการดื้อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลาในฟาร์มสุกร [19-23] นอกจากนี้ ซัลโมเนลลาที่ดื้อยาปฏิชีวนะไม่เพียงแต่ส่งผลกระทบต่อการผลิตสุกรเท่านั้น แต่ยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ผ่านการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์ ห่วงโซ่อาหาร และสิ่งแวดล้อม [24] ผลกระทบที่ตามมาด้านสุขภาพของมนุษย์ คือ อาจมีผลต่อความท้าทายในการรักษาของแพทย์ รวมถึงระยะเวลาการเจ็บป่วยที่ยาวนานขึ้น และอัตราการเสียชีวิตที่เพิ่มขึ้น [25] ดังนั้น กลยุทธ์ใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก

แบคทีริโอเฟจ (Bacteriophage) หรือเฟจ เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดความชุกของซัลโมเนลลาในกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์จากฟาร์มจนกระทั่งมือผู้บริโภค และการประยุกต์ใช้เฟจมีผลดีทั้งสุขภาพสัตว์และมนุษย์ อีกทั้งเฟจสามารถลดการกระจายของแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ และสามารถรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงแบคทีเรียที่ดื้อยาหลายชนิด (multidrug-resistant bacteria, MDR) [26] อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของการรักษาจะแตกต่างกันไปตามความซับซ้อนของเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรีย และตำแหน่งที่ติดเชื้อ [27] เฟจแต่ละชนิดมีช่วงโฮสต์ที่แตกต่างกัน ดังนั้น การเลือกเฟจที่มีช่วงโฮสต์กว้างจึงมีความจำเป็น และเป็นประโยชน์สำหรับการใช้เฟจเพื่อรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ [28] ในอีกทางหนึ่ง เฟจผสม (phage cocktails) ถูกใช้เพื่อรักษาการติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ วิธีการนี้อาจเป็นประโยชน์ในการจัดการกับแบคทีเรียที่พัฒนาความต้านทานต่อเฟจบางชนิด [29, 30] นอกจากนี้มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่า เฟจสามารถควบคุมการติดเชื้อซัลโมเนลลา ในสุกรได้ [31-34]

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 คัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ *S. Choleraesuis* KPS585 KPS604-1 และ KPS615 ที่คัดแยกได้จากลำไส้สุกรติดเชื้อ
- 1.2.2 คัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ทั้ง 3 สายพันธุ์
- 1.2.3 ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ทั้ง 3 สายพันธุ์
- 1.2.4 ประเมินประสิทธิภาพของเฟจแต่ละชนิด และเฟจผสม (phage cocktail) ที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ในสภาวะจำลองของเหลวในลำไส้ (simulated intestinal fluid, SIF)

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1.3.1 คัดเลือกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* KPS585, KPS604-1 และ KPS615 ที่คัดแยกได้จากลำไส้สุกรติดเชื้อ ซึ่งใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับคัดเลือกเฟจที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 85 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรียโอเฟจที่คัดแยกโดยใช้ *S. Enteritidis* DMST8536 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จำนวน 20 ไอโซเลท *S. Anatum* DMST50705 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จำนวน 10 ไอโซเลท *S. Rissen* DMST7097 เป็นเซลล์เจ้าบ้านจำนวน 26 ไอโซเลท และ *S. Typhimurium* ATCC13311 DMST562 เป็นเซลล์เจ้าบ้านจำนวน 29 ไอโซเลท
- 1.3.2 คัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* จากตัวอย่างน้ำในจังหวัดนครปฐม
- 1.3.3 ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอเฟจ ได้แก่
 - 1.3.3.1 ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจ (host range test) และประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์โมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ (efficiency of plating, EOP)
 - 1.3.3.2 ศึกษาความเสถียรของแบคทีเรียโอเฟจต่ออุณหภูมิต่าง ๆ และความเสถียรต่อ pH ต่ำ ในสภาวะของเหลวกระเพาะอาหารจำลอง (simulated gastric fluid, SGF)
 - 1.3.3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM)
- 1.3.4 ศึกษาจีโนมแบคทีเรียโอเฟจด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

1.3.5 ทดสอบประสิทธิภาพของเฟจแต่ละชนิด (individual phages) และเฟจผสม (phage cocktail) ต่อการมีชีวิตของ *S. Choleraesuis* ทั้ง 3 ไอโซเลท ในสถานะของเหลวในลำไส้จำลอง (simulated intestinal fluid, SIF)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีริโอเฟจที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม *S. Choleraesuis* ที่ก่อโรคในสุกร และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมการติดเชื้อในสัตว์ได้ในอนาคต



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของซัลโมเนลลา และการก่อโรคในสุกร

ซัลโมเนลลาจัดอยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* มีรูปร่างท่อน ย้อมติดสีแกรมลบ เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ มีแฟลกเจลลาแบบยื่นออกมารอบ ๆ เซลล์ (peritrichous flagella) ยกเว้น *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เชื้อสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง คือ 5-45 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 35-37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ pH ต่ำ [35] ทั้งนี้ ซัลโมเนลลามีระบบจีโนมที่ซับซ้อนจึงทำให้สามารถตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมรุนแรงที่แตกต่างกัน ปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อการเจริญประกอบด้วย อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และค่าแอกติวิตีของน้ำต่ำเกินกว่าช่วงการเติบโตปกติ [36] เชื้อสามารถเจริญได้ในพืช และสามารถอยู่รอดได้ในโปรโตซัว ดิน และน้ำ อีกทั้งสามารถแพร่เชื้อได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลา และแมลง ดังนั้น เชื้อสามารถติดต่อจากสัตว์สู่มนุษย์โดยการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนมาจากสัตว์ เช่น สัตว์ปีก เนื้อสุกร เนื้อวัว ไข่ และนม เป็นต้น [37]

การติดเชื้อซัลโมเนลลาในสุกร ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ 1886 โดย Salmon และ Smith คือ *S. Choleraesuis* ก่อให้เกิดโรคอหิวาต์สุกร (hog Cholera) และเป็นเชื้อหลักที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ในสุกร โดยทั่วไปสุกรที่ติดเชื้อ *S. Choleraesuis* จะเกี่ยวข้องกับภาวะโลหิตเป็นพิษ ซึ่งจะแสดงลักษณะอาการของโรคตับอักเสบ (hepatitis) และปอดบวม (pneumonia) โรคซัลโมเนลโลซิส (salmonellosis) ในสุกร เกิดขึ้นจากโรคทางคลินิกทั่วไปอย่างใดอย่างหนึ่ง ได้แก่ โรคท้องร่วง (enterocolitis) ซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อซัลโมเนลลาซีโรวาร์ที่หลากหลาย แต่ส่วนใหญ่เกิดจาก *S. Typhimurium* และภาวะโลหิตเป็นพิษเกิดจาก *S. Choleraesuis* ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบอวัยวะหลายส่วน [16] และโรคซัลโมเนลโลซิสในลำไส้ของสุกร มักพบบ่อยในสุกรที่หย่านมและสุกรที่กำลังโต [38] ประเทศในทวีปยุโรป และทวีปอเมริกาเหนือ มักพบการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในสุกร ซึ่งปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ คือ ความเจ็บป่วยที่ถ่ายทอดซึ่งกันและกัน และสภาพแวดล้อมที่ไม่ถูกสุขลักษณะจึงทำให้เกิดการสัมผัสเชื้อในปริมาณสูง ทั้งนี้ ความสามารถของซัลโมเนลลาที่ก่อให้เกิดโรคนั้นขึ้นอยู่กับซีโรวาร์ที่ติดเชื้อ และอายุของสุกร [17] การติดเชื้อซัลโมเนลลา

นอกจากทำให้เกิดโรคต่าง ๆ แล้ว ยังส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในลำไส้อีกด้วย มีรายงานของ Argüello และคณะ [39] พบว่า หลังการติดเชื้อซัลโมเนลลาส่งผลกระทบต่อชีวนิเวศ-จุลชีพ (microbiota) ในลำไส้เล็ก ซึ่งมีผลกระทบแรกต่อจุลินทรีย์บริเวณเยื่อบุลำไส้เล็กส่วนต้น (ileum mucosa) และมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเซลล์เจ้าบ้านต่อการติดเชื้อ อาจเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้จุลินทรีย์ในลำไส้ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* *Prevotella* หรือ *Megasphaera* ถูกทำลายไป และเกิดการทำงานร่วมกันของ *Akkermansia* หรือ *Citrobacter* ที่เพิ่มมากขึ้น

โรคซัลโมเนลโลซิส สามารถเกิดได้ทั้งในมนุษย์ และสัตว์ เมื่อมีการบริโภคอาหารที่มีซัลโมเนลลาเข้าไป การติดเชื้อซัลโมเนลลาในสุกรที่ไม่มีอาการอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อซัลโมเนลลาในมนุษย์ผ่านการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมู [40] สำหรับโรคซัลโมเนลโลซิสในสุกร แบ่งกลุ่มอาการของโรคทางคลินิกออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอาการของภาวะโลหิตเป็นพิษ ซึ่งเกี่ยวข้องกับ *S. Choleraesuis* โดยอาการของโรค คือ มีอาการไอ หายใจลำบาก ง่วงซึม เบื่ออาหาร ใช้สูงถึง 41.6 องศาเซลเซียส และบริเวณหู และช่องท้องมีสีเขียวคล้ำ สามารถเกิดได้ในสุกรทุกเพศ ทุกวัย โดยเฉพาะสุกรอายุ 3 สัปดาห์ ถึง 5 เดือน จะเป็นกลุ่มที่ได้รับผลกระทบมากที่สุด และจะเริ่มแสดงอาการหลังการติดเชื้อ 24-36 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มอาการของโรคลำไส้อักเสบ ซึ่งเกี่ยวข้องกับ *S. Typhimurium* หรือซีโรวารอื่น ๆ สำหรับอาการเบื้องต้น คือ ถ่ายเป็นน้ำมีสีเหลือง ซึ่งจะเกิดอาการนี้ไม่ถึง 1 สัปดาห์ แต่จะมีอาการเบื่ออาหาร เป็นไข้ และภาวะขาดน้ำตามมา ส่วนใหญ่มักพบในสุกรอายุ 3 สัปดาห์ ถึง 4 เดือน [6, 38, 41] และมีรายงานของ Demirbilek [16] พบว่า การติดเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสุกร มักพบในสุกรที่มีน้ำหนักไม่เกิน 120 ปอนด์ (young swine) และสุกรที่มีน้ำหนักมากกว่า 120 ปอนด์ (older swine) ในขณะที่ *S. Typhimurium* จะพบในสุกรที่มีช่วงอายุ 6-12 สัปดาห์ และไม่ค่อยพบในสุกรที่โตเต็มวัย

2.2 การแพร่กระจายของซัลโมเนลลาในสุกร

สุกรสามารถแพร่กระจายเชื้อโดยเชื้อจะถูกขับถ่ายออกมาทั้งอุจจาระ และติดต่อเข้าสู่อีกตัวหนึ่งโดยผ่านเข้าทางปาก (fecal-oral route) และเนื่องจากเชื้อมักจะถูกขับถ่ายออกมาจำนวนมากในอุจจาระ ดังนั้นอุจจาระจึงเป็นแหล่งการแพร่กระจายของเชื้อที่สำคัญ ทั้งนี้ต่อมทอนซิล และปอดถือเป็นจุดสำคัญสำหรับการบุกรุก และการแพร่กระจายของซัลโมเนลลาเช่นเดียวกัน [17] และการแพร่กระจายของเชื้อสามารถแพร่ผ่านจากการสัมผัสจมูกสู่จมูก โดยการแพร่เชื้ออาจเกิดจากเชื้อที่พบในน้ำมูกของสุกรที่ติดเชื้อ และเชื้อในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ซึ่งมีความสำคัญต่อการบุกรุกของเชื้อ [42]

อีกทั้ง อนุภาคในอากาศที่มีเชื้อยังเพิ่มความน่าจะเป็นของการแพร่กระจายของซัลโมเนลลาผ่านทาง การสัมผัสสูงๆได้อีกด้วย [43] นอกจากนี้ การแพร่กระจายเชื้อสามารถแพร่โดยมีอาหาร เป็นสื่อกลาง ได้แก่ ส่วนผสมของอาหารสัตว์ ภาชนะ หรืออุปกรณ์ที่ใช้สำหรับผสมอาหารที่มีการ ปนเปื้อนของเชื้อ ในงานวิจัยของ Hedemann และคณะ [44] พบว่า สุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดมัก พบการปนเปื้อนของเชื้อที่สูง เนื่องจากอาหารที่ถูกอัดเม็ดสามารถจับเชื้อ และทำให้เกิดการตั้งรกราก ของเชื้อในอาหารได้ดี ดังนั้นอาหารสัตว์ที่อัดเม็ดจึงสามารถทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในสุกร ได้ และงานวิจัยของ Gray และคณะ [45] พบว่า สุกรบางตัวสามารถขับถ่ายเชื้อซัลโมเนลลาที่มีการ ปนเปื้อนในระดับต่ำได้ก่อนการฆ่า ซึ่งอาจส่งผลให้สุกรสามารถแพร่กระจายเชื้อได้อย่างรวดเร็วในฝูง สุกรจำนวนมากในฟาร์ม และความเครียดของสุกรก็เป็นปัจจัยหนึ่งของการแพร่กระจายเชื้อ เนื่องจาก สุกรจะขับถ่ายเชื้อออกมาได้จำนวนมากในอุจจาระจึงทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้ออย่างรวดเร็ว และอาจเกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่สะอาด [46]

2.3 การปนเปื้อนซัลโมเนลลาในสุกร และผลิตภัณฑ์จากสุกร

สุกรสามารถติดเชื้อได้จากหลากหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นสภาพแวดล้อมภายในฟาร์ม การ ติดเชื้อระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ ในฟาร์ม การปนเปื้อนระหว่างฟาร์ม และในโรงฆ่าสัตว์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ภูมิภาคที่อาศัย และประเภทของฟาร์มด้วย นอกจากนี้ คอกพักสุกรถือเป็นแหล่งแรกที่สำคัญของการ ปนเปื้อนซัลโมเนลลาในโรงฆ่าสัตว์ และสภาพแวดล้อมภายในฟาร์มเป็นแหล่งที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน ของซากสัตว์มากกว่าการปนเปื้อนที่เกิดจากสุกรด้วยตัวเอง [47] และการปนเปื้อนของเนื้อหมูอาจ เกิดขึ้นจากการสัมผัสเชื้อจากอุปกรณ์ เครื่องมือ หรือการเก็บรักษาในที่ที่ไม่เหมาะสมในระหว่างการ ฆ่า หลังการฆ่า การวางจำหน่ายในท้องตลาด [48] และการปนเปื้อนของเนื้อหมู อาจเกิดขึ้นจากการ สัมผัสเชื้อจากอุปกรณ์ เครื่องมือ หรือการเก็บรักษาในที่ที่ไม่เหมาะสมในระหว่างการฆ่า หลังการฆ่า การวางจำหน่ายในท้องตลาด [49] มีงานวิจัยหลายฉบับที่ได้ศึกษาการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาใน สุกร และผลิตภัณฑ์จากสุกร เช่น

Botteldoorn และคณะ [8] ได้แยกเชื้อซัลโมเนลลาจากซากสุกร ลำไส้ใหญ่ และ ต่อมน้ำเหลืองในช่องท้อง โดยเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ที่แตกต่างกันจำนวน 5 แห่ง พบว่า ซากสุกร มีการปนเปื้อนเชื้อมากที่สุดคิดเป็น 37% และพบการปนเปื้อนข้ามของซากสัตว์คิดเป็น 29% ส่วน สภาพแวดล้อมของโรงฆ่าสัตว์ก่อนที่จะมีการเชือด พบการปนเปื้อนอยู่ 25% ซิโรวารที่พบปนเปื้อนใน สภาพแวดล้อมโรงฆ่าสัตว์ และส่วนของลำไส้ใหญ่ คือ *S. Typhimurium*, *S. Livingstone* และ

S. Derby ส่วนซาคัสต์ว์ พบ S. Typhimurium เป็นส่วนใหญ่ และบริเวณต่อน้ำเหลือทิ้งในช่องท้อง พบความหลากหลายซีโรวาร์ของซัลโมเนลลามากที่สุด

Meyer และคณะ [9] ได้เก็บตัวอย่างเนื้อดิบ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัวและหมู ในโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 7 แห่ง ที่แตกต่างกันของประเทศเยอรมนี (Southern Germany) จำนวน 4,170 ตัวอย่าง เป็นระยะเวลา 11 เดือน ซึ่งวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี enzyme-linked fluorescent immunoassay (ระบบ VIDAS) และยืนยันผลการทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ xylose lysine deoxycholate (XLD) ผลการวิเคราะห์โดยระบบ VIDAS พบซัลโมเนลลาในส่วนต่าง ๆ ของสุกร ดังนี้ ส่วนลิ้น 7.5% ตับ 5.5% หัวใจ 3.5% ซากสุกร 1.7% และส่วนที่ถูกตัดแบ่งออกเป็นส่วน ๆ 1.0% และจากการสำรวจโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 7 แห่ง พบการปนเปื้อนเชื้อในโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 5 แห่ง

Piras และคณะ [7] ได้แยกซัลโมเนลลาจากสุกรหลังถูกฆ่า พบว่า ซากสุกรมีความชุกของซัลโมเนลลาสูงสุด พบ 18% ตามด้วยส่วนของลำไส้ใหญ่ 14.8%, ต่อน้ำเหลือทิ้ง 13% และตับ 1.6% ส่วนซีโรวาร์ที่พบมากที่สุด คือ S. Anatum พบการปนเปื้อน 71.8% ตามด้วย S. Derby พบ 33.3%, S. Bredeney พบ 5% และ S. Holcomb พบ 2.5%

Rondón-Barragán และคณะ [50] ได้แยกซัลโมเนลลาจากซากสุกร สิ่งแวดล้อมภายในโรงฆ่าสัตว์ และ วัสดุที่เป็นพาหะนำเชื้อโรค เช่น พื้นผิวของมิด ตะขอ พื้น ท่อเก็บน้ำ พื้นผิวการทำงาน และรถบรรทุกขนส่ง พบว่า ซัลโมเนลลาที่แยกได้จากเนื้อ คิดเป็น 40% และจากบนพื้นผิวซากสุกร คิดเป็น 16% ส่วนเชื้อที่แยกได้จากวัสดุที่เป็นพาหะนำเชื้อโรค แบ่งเป็น มิด ตะขอ และ ท่อเก็บน้ำ คิดเป็นอย่างละ 12% ส่วนพื้น คิดเป็น 8%

Patchanee และคณะ [51] ศึกษาความชุกของซัลโมเนลลาในเนื้อหมูที่วางขายในตลาดสด ค้าปลีก และซูเปอร์มาเก็ตในอำเภอเมืองเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างตลอดเดือนเมษายน ถึง กันยายน ปี 2014 จากตัวอย่างเนื้อหมูทั้งหมด 82 ตัวอย่าง พบความชุกของซัลโมเนลลาในตลาดสด คิดเป็น 73.2% และซูเปอร์มาเก็ต คิดเป็น 9.8% และซีโรวาร์ที่พบบ่อยที่สุด คือ S. Rissen

Ngo และคณะ [52] เก็บตัวอย่างเนื้อหมูทั้งหมด 671 ตัวอย่าง โดยรวบรวมจากช่องทาง การค้าปลีกต่าง ๆ ใน 3 จังหวัดทางภาคเหนือของเวียดนาม ผลการตรวจสอบพบความชุกของซัลโมเนลลาในเนื้อหมูขายปลีก คิดเป็น 58.1% และการปนเปื้อนของเชื้อในธุรกิจค้าปลีกดั้งเดิม ธุรกิจค้าปลีกสมัยใหม่ และธุรกิจบริการด้านอาหาร คิดเป็น 60.5%, 50.9% และ 80.5% ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อหมูสดของธุรกิจค้าปลีกดั้งเดิม

ธุรกิจค้าปลีกสมัยใหม่ และธุรกิจบริการด้านอาหาร คือ 6.51 ± 0.64 , 6.38 ± 0.65 และ 6.96 ± 0.85 log CFU/กรัม ตามลำดับ

จากการศึกษาการปนเปื้อนซัลโมเนลลาในสุกร และผลิตภัณฑ์จากสุกรของตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า เชื้อสามารถเกิดการปนเปื้อนได้ตั้งแต่ฟาร์มเลี้ยงสุกร ชากสุกร กระบวนการแปรรูป วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในโรงฆ่าสัตว์ ตลอดจนอาหารสำหรับสัตว์ก็สามารถเกิดการปนเปื้อนได้

2.4 การสื่อสารต้านจุลชีพของซัลโมเนลลาในสุกร

ในประเทศไทยการผลิตสุกรเพิ่มขึ้นอย่างมากในทศวรรษที่ผ่านมาเพื่อตอบสนองความต้องการเนื้อหมูที่เพิ่มขึ้น และมีการใช้ยาต้านจุลชีพเป็นประจำในการผลิตสุกรเพื่อรักษาโรคติดเชื้อและเพิ่มผลผลิต อย่างไรก็ตาม การใช้สารต้านจุลชีพในการฆ่าเชื้อก่อโรคมักก่อให้เกิดเชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่เพิ่มขึ้น โดยส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์และมนุษย์ สารต้านจุลชีพถูกนำมาใช้ในสุกรเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต เพื่อป้องกันการติดเชื้อ และใช้รักษากลุ่มของสัตว์เมื่อแสดงอาการติดเชื้อ ซึ่งมีการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดในการรักษาโรค โดยทั่วไปสุกรจะถูกให้ยาที่ละลายในน้ำหรือโดยการฉีด [53] รวมทั้งการผสมยาปฏิชีวนะในน้ำดื่ม และอาหาร มีรายงานของ Gomes-Neves และคณะ [54] พบว่า สภาพแวดล้อมในโรงฆ่าสัตว์และห้องปฏิบัติการชำแหละสุกรเป็นแหล่งสะสมซีโรไทป์ที่ดื้อยาหลายขนาน (multidrug-resistant tuberculosis; MDR) รวมถึงสามารถเกิดการปนเปื้อนข้ามผ่านผู้ชำแหละเนื้อได้อีกด้วย และถึงแม้ว่าฟาร์ม และสิ่งแวดล้อมในโรงฆ่าสัตว์จะแยกกัน แต่ถือว่าเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อ และเป็นจุดเชื่อมต่อกันที่สำคัญของการแพร่กระจายของซัลโมเนลลาที่ดื้อยาในฝูงสุกร [22] และมีการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ รวมทั้งการใช้ยาต้านจุลชีพโดยไม่ใช้การรักษา นำไปสู่การถ่ายทอด และการกระจายของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพจำนวนมาก [55] นอกจากนี้มูลสุกรที่ปนเปื้อนเชื้อสามารถเกิดการแพร่กระจายของซัลโมเนลลาที่ดื้อยาในสิ่งแวดล้อมได้ และพบว่าสามารถคงอยู่ในดินเป็นเวลาอย่างน้อย 21 วัน [56]

มีรายงานที่รวบรวมการใช้ยาปฏิชีวนะในสุกร ระหว่างปี 2000 ถึง 2017 จำนวน 36 บทความ ซึ่งมีการศึกษามากกว่า 85% ในยุโรป และอเมริกาเหนือ พบว่า กลุ่มยาเพนิซิลลิน (penicillin) และเตตราไซคลิน (tetracyclines) เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันมากที่สุดในหลายประเทศ ซึ่งมีการให้ยาปฏิชีวนะผ่านทางปากโดยตรงในสุกรช่วงตุนนม และสุกรหลังหย่านม นอกจากนี้ประเภทและขนาดของฟาร์มสัมพันธ์กับการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงสุกรสำหรับขุน

(finisher farms) และฟาร์มขนาดใหญ่ จะมีการให้ยาปฏิชีวนะที่มากกว่าระบบการเลี้ยงสุกรแบบเบ็ดเสร็จตั้งแต่คลอดจนถึงขุนส่งตลาด (farrow-to-finish farms) และฟาร์มขนาดเล็ก [57] และมีรายงานของ Lekagul และคณะ [58] พบว่า ยาอะม็อกซิซิลลิน (amoxicillin) และโคลิสติน (colistin) จัดเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันมากทั้งในฟาร์มสุกร และโรงงานอาหารสัตว์ และส่วนใหญ่มีการผสมยาปฏิชีวนะรวมกับอาหารสัตว์ ยาโคลิสตินจัดเป็นตัวเลือกแรกของยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับรักษาโรคท้องร่วงในสุกร ส่วนตัวเลือกที่สอง คือยานีโอไมซิน (neomycin) ยาไตรเมโทพริม/ซัลโฟนาไมด์ (trimethoprim/sulfonamide) และยาสเตรปโตมัยซิน (spectinomycin) วิธีการให้ยาโดยการผสมยาปฏิชีวนะในน้ำดื่ม และอาหาร ส่วนยาปฏิชีวนะสำหรับรักษาโรคติดเชื้อในกระแสเลือด ตัวเลือกแรก คือ ยาไตรเมโทพริม/ซัลโฟนาไมด์ และตัวเลือกที่สองคือยาอะม็อกซิซิลลิน วิธีการให้ยาโดยการฉีด [59] ทั้งนี้การใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินไปจนเกิดความจำเป็น หรือใช้เพื่อป้องกันการติดเชื้อ ส่งผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อที่หลากหลาย และการใช้ยาปฏิชีวนะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ ซึ่งจุลินทรีย์ในลำไส้สุกร ค่อนข้างมีความหลากหลายและแตกต่างกันตามตำแหน่งที่อาศัยอยู่ และพบว่าสุกรที่มีอายุมาก จะได้รับผลกระทบต่อบุคลากรในลำไส้ น้อยกว่าสุกรที่มีอายุน้อย [60] และมีงานวิจัยของ Chiu และคณะ [12] ได้ศึกษาการดื้อยาของ *S. Choleraesuis* ซึ่งเป็นซีโรวาร์ที่พบมากในการติดเชื้อของสุกร พบว่า เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) ไตรเมโทพริม/ซัลโฟนาไมด์ และโดยเฉพาอย่างยิ่ง ยาปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) ดังนั้นจึงเป็นความกังวลเกี่ยวกับการใช้ยาปฏิชีวนะเหล่านี้สำหรับรักษาการติดเชื้อในสุกร และมีงานวิจัยอีกหลายชิ้นที่ศึกษาการดื้อสารต้านจุลชีพของซัลโมเนลลาที่แยกได้จากสุกร เช่น

Sisak และคณะ [61] แยกซัลโมเนลลาจากสุกร ได้ทั้งหมด 126 ไอโซเลท และนำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้งหมด 13 ชนิด ได้แก่ ampicillin (10 µg) amoxycillin/clavulanic acid (30 µg) apramycin (15 µg) colistin (10 µg) sulphamethoxazole/trimethoprim (25 µg) cefotaxime (30 µg) enrofloxacin (5 µg) gentamicin (10 µg) neomycin (30 µg) streptomycin (10 µg) tetracycline (30 µg) chloramphenicol (30 µg) nalidixic acid (30 µg) และ sulphonamides (300 µg) พบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 1–8 ชนิดใน 64 ไอโซเลท (59.8%) และพบ *S. Typhimurium* ดื้อต่อยา streptomycin มากสุด คือ 91.5% ตามด้วย sulphonamides 88.1% ampicillin 86.4% tetracycline 84.7% และ chloramphenicol 83.0% ตามลำดับ

Jiang และคณะ [21] ศึกษาความชุก และความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลาที่แยกได้จากอุจจาระของสุกรที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ สุกรที่ไม่มีการติดเชื้อ และสุกรหลังการฆ่าทั้งหมด 1,732 ตัวอย่าง เก็บรวบรวมนานกว่า 8 เดือน ซึ่งซีโรวาร์ที่พบทั่วไป คือ *S. Derby* และ *S. Typhimurium* และพบว่าเชื้อดื้อต่อยา ciprofloxacin สูงสุด 100% ตามด้วย tetracycline 99.4% doxycycline 97% sulfamethoxazole 85.8% ampicillin 81.6% และ amoxicillin 80.4% และพบการดื้อยาหลายขนาน (MDR) มากถึง 7 ชนิดของยาปฏิชีวนะ โดย *S. Derby* พบการดื้อยาหลายขนานสูงสุด คิดเป็น 25%

Gil Molino และคณะ [62] ศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของ *S. Choleraesuis* แยกได้จากหมูป่า (wild boar) และหมูที่เลี้ยงในแถบคาบสมุทรไอบีเรีย (Iberian pig) โดยทดสอบกับยาปฏิชีวนะทั้งหมด 14 ชนิด ได้แก่ ampicillin (10 µg) cefotaxime (30 µg) ceftiofur (30 µg) gentamicin (10 µg) neomycin (30 µg) streptomycin (10 µg) tetracycline (30 µg) doxycycline (30 µg) enrofloxacin (5µg) nalidixic acid (30µg) trimethoprim/sulfamethoxazole (23.75/1.25 µg) sulfonamide (200 µg) chloramphenicol (30 µg) โดยทำการทดสอบด้วยวิธี Disc-diffusion ส่วน Colistin จะทำการทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution ผลการทดสอบพบว่าการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ *S. Choleraesuis* เกือบทุกไอโซเลท ซึ่งพบอย่างน้อย 1 ใน 14 ชนิดของยาปฏิชีวนะ (19/20; 95%) โดยเชื้อดื้อต่อยา ampicillin และ sulfonamide มากที่สุด (14/20) นอกจากนี้พบการดื้อยาหลายขนาดของ *S. Choleraesuis* คิดเป็น 65% (13/20) ซึ่งดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิดขึ้นไป

Tadee และคณะ [23] ได้แยกซัลโมเนลลาจากฟาร์มสุกรอินทรีย์ ในภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 112 ตัวอย่าง จากฟาร์ม 11 แห่ง โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม ถึง ธันวาคม ปี 2018 พบว่าซัลโมเนลลาที่แยกได้ดื้อต่อยา tetracycline คิดเป็น 89.3% ampicillin คิดเป็น 78.6% และ sulfamethoxazole-trimethoprim คิดเป็น 71.4%

Jiang และคณะ [63] ได้แยกซัลโมเนลลาจากเนื้อหมูขายปลีกในตลาด และอวัยวะภายในของสุกร ได้แก่ ตับ และน้ำดี โดยเก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมีนาคม ถึง ตุลาคม ปี ค.ศ.2019 จำนวน 1,441 ตัวอย่าง พบว่า ซัลโมเนลลาที่แยกได้มีอัตราการดื้อต่อยา tetracycline สูงถึง 96.5% ตามด้วย sulfisoxazole คิดเป็น 96.3% amoxicillin คิดเป็น 85.2% ampicillin คิดเป็น 84.4% และ streptomycin คิดเป็น 83.7%

จากรายงานหลายฉบับที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในปัจจุบันได้กลายเป็นปัญหาในการรักษาที่สำคัญ อีกทั้งยังพบเชื้อที่ดื้อยาหลายขนาน ดังนั้นแบคทีเรียโอเฟจจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการบำบัดรักษา เพื่อควบคุมการติดเชื้อซัลโมเนลลาในสุกรแทนการใช้ยาปฏิชีวนะที่ใช้มากในปัจจุบัน

2.5 แบคทีเรียโอเฟจ (Bacteriophage)

แบคทีเรียโอเฟจ หรือเฟจ คือไวรัสที่ติดเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงอาร์เคีย และเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบมากที่สุดในโลก สามารถดำรงชีวิตอย่างแพร่หลายในโพรคาริโอต นอกจากนี้ ในทุกสภาพแวดล้อมเฟจเป็นส่วนหนึ่งของระบบนิเวศของจุลินทรีย์ที่ซับซ้อน [64] เฟจถูกค้นพบมานานกว่าร้อยปี ในปี ค.ศ.1896 Ernest Hanbury Hankin นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ ได้พบสิ่งมีชีวิตบางอย่างในน้ำนมของแม่น้ำในอินเดีย และพบว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหิวทกโรค แต่อย่างไรก็ตามเขาไม่ได้ติดตามการค้นพบนี้ต่อ และในปี ค.ศ.1915 นักพยาธิวิทยา ชาวอังกฤษ คือ Frederick Twort ค้นพบสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ติดเชื้อ และฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารได้ แต่การศึกษาถูกชะงักเนื่องจากเกิดสงครามโลกครั้งที่ 1 และขาดแคลนเงินทุนในการวิจัย และหลังจากนั้น 2 ปีต่อมา Felix d'Herelle นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศส-แคนาดา และผู้ร่วมค้นพบสิ่งที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยบังเอิญที่สถาบันปาสเตอร์ (Pasteur Institute) ประเทศฝรั่งเศส เขาสังเกตว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไว้หายไประหว่างนำผ่านตัวกรองที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย และเขาได้สังเกตเห็นสิ่งที่เขาค้นพบต่อมาเรียกแบคทีเรียโอเฟจในเม็กซิโกเป็นครั้งแรก และเขาได้เขียนเรื่องราวเกี่ยวกับการค้นพบในปี ค.ศ.1949 ประมาณ 40 ปีหลังจากที่เขาค้นพบสิ่งนี้ และได้ทดลองความเป็นไปได้ของการบำบัดเฟจ และเป็นคนแรกที่ทดสอบประสิทธิภาพของเฟจในสัตว์ และพบว่าการรักษาด้วยเฟจช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของไก่ที่เป็นโรคไทฟอยด์ได้ 95–100% ในปี ค.ศ. 1923 Eliava Institute ได้เปิดขึ้นในเมืองทบิลีซี ประเทศจอร์เจีย ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียโอเฟจ และพัฒนาการบำบัดด้วยเฟจซึ่งมีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากก็ได้มีส่วนร่วมในการพัฒนาเทคนิคการศึกษาเฟจสำหรับการใช้งานเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ และในปี ค.ศ. 1969 Max Delbrück, Alfred Hershey และ Salvador Luria ได้รับรางวัลโนเบลอันทรงเกียรติด้านสรีรวิทยา และยา ซึ่งค้นพบการจำลองแบบของไวรัสและโครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัส [65-67] เฟจมีความหลากหลายมากในธรรมชาติในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน หากสภาพแวดล้อมอุดมสมบูรณ์ไปด้วยแบคทีเรีย ก็จะสามารถพบความหลากหลายของเฟจในสิ่งแวดล้อมนั้น และเซลล์เจ้าบ้าน (host) เป็นทรัพยากรหลักสำหรับเฟจ เช่น กิจกรรมเมแทบอลิซึมของเซลล์เจ้าบ้าน เป็นปัจจัยสำคัญในทุกขั้นตอนของวงจรชีวิตของเฟจ [68]

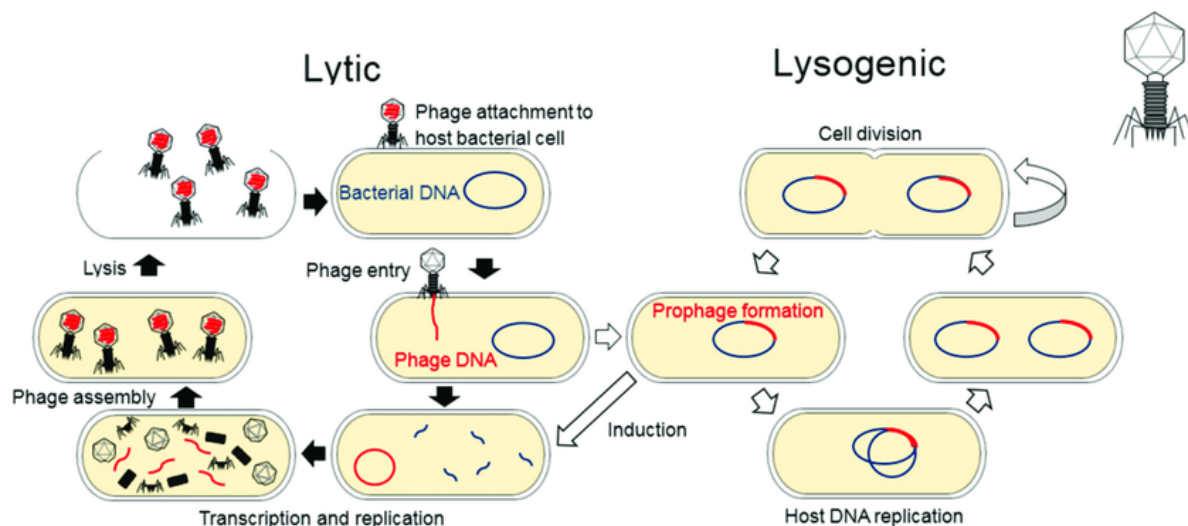
2.5.1 วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจภายในเซลล์แบคทีเรีย

การเพิ่มจำนวนของเฟจภายในเซลล์แบคทีเรีย มี 2 วงจรที่แตกต่างกัน คือ วงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) และวงจรชีวิตแบบไลโซจีนิก (lysogenic cycle) ดังนี้ (ภาพที่ 1)

วงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) เริ่มจากเฟจจะจับกับแบคทีเรียในระหว่างเคลื่อนที่แบบสุ่มบนพื้นผิวแบคทีเรีย และจะยึดเกาะกับตำแหน่งตัวรับ (receptor site) ที่จำเพาะเจาะจงที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย หรือส่วนประกอบต่าง ๆ บนผิวเซลล์อย่างใดอย่างหนึ่ง อาจเป็นตำแหน่งที่อยู่บนแคปซูล (capsule) แฟลกเจลลา (flagella) หรือ พิลิ (pili) ซึ่งการยึดเกาะในขั้นต้นนี้เป็นการยึดเกาะที่สามารถย้อนกลับได้ (reversible adsorption) แต่หลังจากนั้นจะเป็นการยึดเกาะที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversible adsorption) และตามด้วยการถ่ายโอนสารพันธุกรรมของเฟจไปยังเซลล์เจ้าบ้าน และใช้กลไกต่าง ๆ ภายในเซลล์ในการเพิ่มจำนวน หลังจากการสร้างและประกอบอนุภาคเฟจใหม่ภายในเซลล์เจ้าบ้าน (assembly) ซึ่งเรียกว่า “progeny phage” จากนั้นจะผลิตเอนไซม์เอนโดไลซิน (endolysin) ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน และปลดปล่อย progeny phage ออกมาสู่ภายนอก [69]

วงจรชีวิตแบบไลโซจีนิก (lysogenic cycle) คือ เมื่อเฟจมีการถ่ายโอนสารพันธุกรรมไปยังเซลล์เจ้าบ้าน สารพันธุกรรมที่ถ่ายโอนไปจะเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน ไม่ทำให้เกิดการสร้างอนุภาคเฟจใหม่ภายในเซลล์ และจะไม่ทำให้เซลล์แตก สารพันธุกรรมที่ถูกแทรกในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านจะเรียกว่า “prophage” เซลล์อาจได้รับการแบ่งตัวหลายรอบ แต่บางครั้งเซลล์อาจจะสลายโดยธรรมชาติ และปลดปล่อย progeny phage ออกมา ซึ่งสิ่งที่จะชักนำให้เกิดการสลายของเซลล์ไลโซจีนิก เช่น การบำบัดด้วยสารก่อกลายพันธุ์ หรือการสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเล็ต และการรวมของดีเอ็นเอของเฟจเข้ากับโครโมโซมของแบคทีเรียอาจเป็นประโยชน์ต่อวิวัฒนาการของแบคทีเรีย เนื่องจากยีนที่เป็นประโยชน์อาจถูกถ่ายโอนไปยังแบคทีเรีย [70] นอกจากนี้ในแง่ของเฟจบำบัด วงจรชีวิตแบบไลโซจีนิกเป็นอุปสรรคอย่างมากสำหรับการบำบัดด้วยเหตุผลหลายประการ ประการแรก คือถ้าจีโนมของเฟจสอดแทรกเข้าไปรวมกับจีโนมเซลล์เจ้าบ้านจะส่งผลให้ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทันที ส่วนประการที่สอง วงจรชีวิตแบบไลโซจีนิกสามารถส่งผลต่อความสามารถในการเจริญ สมรรถนะในการแข่งขันของโฮสต์ (fitness cost) และอาจทำให้โฮสต์ก่อโรครุนแรงมากขึ้น เนื่องจากโฮสต์มีจีโนมของเฟจแทรกอยู่ หรือเกิดจากการถ่ายโอนยีนจากเชื้อก่อโรคหนึ่งไปยังเซลล์ใหม่ โดยอาศัยไลโซจีนิกเฟจเป็นตัวกลาง (horizontal gene transfer) [71] อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Al-Anany และคณะ [72] ได้ศึกษาการทำงานร่วมกันระหว่างเฟจที่มี

วงจรชีวิตแบบไลโซจินิกและยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ในการยับยั้งเชื้ออีโคไลในหลอดทดลอง ผลการทดสอบพบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ $\geq 8 \log \text{CFU/มิลลิลิตร}$ แต่อย่างไรก็ตาม ปฏิกริยาเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาปฏิชีวนะและเฟจขึ้นอยู่กับความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อเป็นหลัก

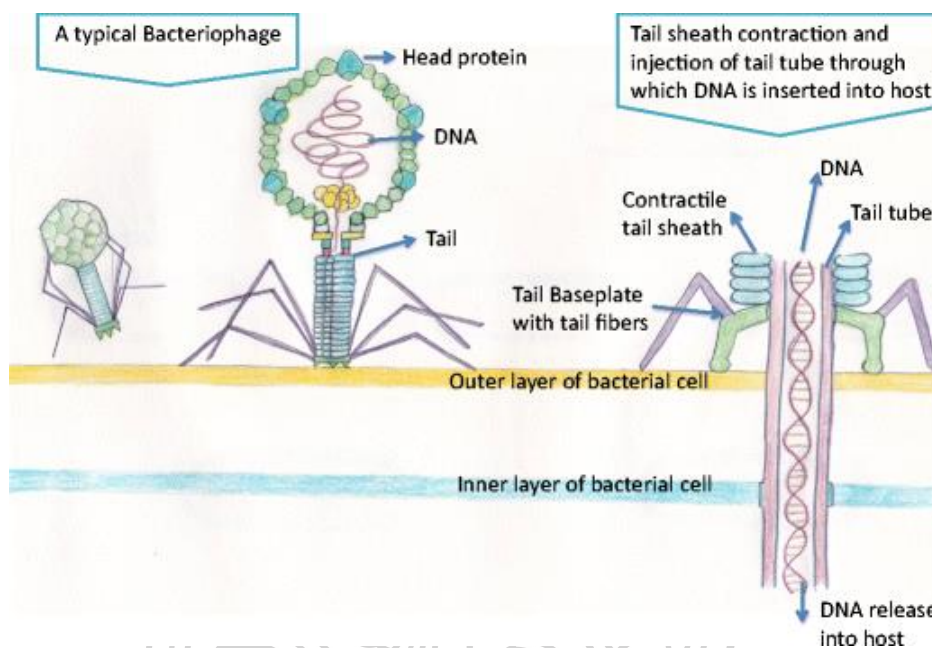


ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของแบคทีริโอเฟจ [73]

2.5.2 โครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ

แบคทีริโอเฟจแต่ละชนิด มีขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 24 ถึง 400 นาโนเมตร และลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของเฟจแตกต่างกันอย่างมาก มีขนาดความยาวตั้งแต่ 18 ถึง 400 กิโลเบส (kilobase; kb) โครงสร้างพื้นฐานของเฟจจะมีส่วนที่เรียกว่า “แคปซิด” (capsid) เป็นการรวมตัวของหน่วยย่อยโปรตีนหนึ่งหน่วยหรือมากกว่าที่เรียกว่า “โปรโตเมอร์” (protomers) และหน่วยย่อยของ capsid เรียกว่า “แคปโซเมอร์” (capsomere) ซึ่งแคปซิดทำหน้าที่ห่อหุ้ม หรือป้องกันจีโนมที่ซ่อนอยู่ภายใน และในบางกรณีอาจมีชั้นที่ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนเพิ่มเติม ซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มจีโนมเฟจ [67] จีโนมเฟจมีสารพันธุกรรม หรือกรดนิวคลีอิกเพียงชนิดเดียว อาจเป็นโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ หนึ่งหรือหลายโมเลกุล อยู่ในรูปแบบสายเดี่ยว (single-stranded) หรือ สายคู่ (double-stranded) และมีลักษณะเป็นวง (circular) หรือเส้น (linear) ซึ่ง double-stranded circular DNA ของแบคทีริโอเฟจจะไม่ได้เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ แต่มักจะเกิดขึ้นแต่ไม่ทุกครั้งหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ ดีเอ็นเอของเฟจอาจถูกเติมน้ำตาล (glucosylation) หรือหมู่เมทิล (methylation) ด้วย ได้เป็น glucose และ methyl residues ซึ่งอาจส่งผลต่อความเสถียรของดีเอ็นเอภายในเซลล์เจ้าบ้าน [74] ทางเป็นส่วนหนึ่งในโครงสร้างของแบคทีริโอเฟจ มีลักษณะเป็นท่อกลวง ทำหน้าที่เป็นช่องทางในการส่งสารพันธุกรรมของเฟจจากส่วน

หัวไปยังไซโทพลาซึม (cytoplasm) ของเซลล์เจ้าบ้าน แต่เฟจบางชนิดก็ไม่มีหาง [75] ตัวอย่างของเฟจมีหาง เช่น เฟจ T4 (รูปที่ 2) เป็นหนึ่งในเฟจที่มีความซับซ้อนมาก ส่วนหางจะติดอยู่กับส่วนเฉพาะที่เป็นตัวเชื่อมต่อของส่วนหัว และมีส่วนของ base plate และ tail fibers ซึ่งติดอยู่กับส่วนหาง ซึ่งช่วยในการยึดเกาะกับเซลล์แบคทีเรีย [76]



ภาพที่ 2 โครงสร้างทั่วไปของเฟจโดยเน้นบริเวณหาง และความสามารถในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านโดยเจาะผนังเซลล์ [75]

2.5.3 การประยุกต์ใช้แบคทีริโอเฟจ

การประยุกต์ใช้เฟจในด้านต่าง ๆ ได้รับความสนใจอีกครั้ง เนื่องจากความต้านทานของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะเริ่มแพร่หลาย ในอดีตมีการใช้เฟจในการรักษาการติดเชื้อ แต่กลับถูกละทิ้งไปในช่วงทศวรรษที่ 1940 เนื่องจากมีการค้นพบยาปฏิชีวนะ [77] และในปี ค.ศ. 1921 ได้มีการสาธิตการใช้เฟจเพื่อรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียเป็นครั้งแรก ต่อมาได้นำเฟจมารักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อ *Pseudomonas* ในมนุษย์ นอกจากนี้ เฟจยังประสบความสำเร็จในการป้องกันการติดเชื้อในสัตว์ เช่น ลูกโค ลูกแกะ และสุกรที่ติดเชื้ออีโคไลในทางเกษตรกรรม [78] และพบว่าการประยุกต์ใช้เฟจมีอัตราความสำเร็จสูงถึง 80–90% เฟจสามารถป้องกัน หรือรักษาโรคท้องร่วง โรคบิด ภาวะโลหิตเป็นพิษ การติดเชื้อจากบาดแผลและรอยไหม้ในมนุษย์ ตลอดจนโรคเกี่ยวกับลำไส้และระบบในสัตว์ [79] ในปัจจุบันมีการนำเฟจไปใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เช่น ใช้เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้าน

แบคทีเรียสำหรับควบคุมโรคติดเชื้อ (phage therapy) เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยชนิดแบคทีเรียก่อโรค (phage typing) หรือใช้เฟจเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อยู่ในจลินัสและสปิชีส์เดียวกันออกเป็นกลุ่มตามความไวต่อการติดเชื้อของเฟจ (bacterial detection) และใช้เฟจในด้านการเกษตร (phage biocontrol) และอุตสาหกรรมอาหาร [80] และเมื่อเทียบประสิทธิภาพของการใช้เฟจ และยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเฟจมีประสิทธิภาพมากกว่ายาปฏิชีวนะ แต่อย่างไรก็ตามเฟจมีข้อดี และข้อจำกัดที่หลากหลาย ดังนี้

ข้อได้เปรียบหลักของการใช้เฟจ คือ เฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย และการรักษาสามารถออกแบบโดยกำหนดแบคทีเรียเป้าหมายได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรค ในขณะที่ไม่ส่งผลเสียต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal microbiota) ในขณะที่การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะจุลินทรีย์ประจำถิ่นและเชื้อก่อโรคจะถูกทำลายไปพร้อม ๆ กัน อย่างไรก็ตาม ระดับความจำเพาะเจาะจงที่สูงของเฟจต่อแบคทีเรีย จึงไม่สามารถรักษาโรคในวงกว้างได้ ดังนั้นอาจจะต้องระบุสาเหตุของการติดเชื้ออย่างแม่นยำ และคัดเลือกเฟจที่เหมาะสมเพื่อนำมาทำเฟจผสม (phage cocktails) [81] และการต้านทานของเชื้อแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าแบคทีเรียสามารถปรับตัวเพื่อต้านทานต่อเฟจได้เช่นเดียวกับการที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ แต่ปัญหาการต้านทานต่อเฟจมีความกังวลน้อยกว่า เนื่องจากเฟจสามารถวิวัฒนาการตามธรรมชาติควบคู่ไปกับแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เจ้าบ้านได้ ดังนั้น เมื่อแบคทีเรียต้านทานต่อเฟจ เฟจจะสามารถปรับตัวและสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ต้านทานได้อีกครั้ง แต่ถ้าหากเฟจไม่สามารถฆ่าแบคทีเรียที่ดื้อยาได้ ก็สามารถหาเฟจจากสิ่งแวดล้อมชนิดใหม่ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้มาทดแทน เนื่องจากการคัดแยกเฟจจากสิ่งแวดล้อมตัวใหม่ง่ายกว่าการคิดค้นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ขึ้นมา [82, 83] นอกจากนี้ เฟจบางชนิดสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่มีการสร้างไบโอฟิล์มขึ้นเพื่อป้องกันการทำลาย [84] เฟจสามารถถูกนำมาใช้ร่วมกับสารต้านแบคทีเรียอื่น ๆ รวมทั้งเฟจชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นการขยายสเปกตรัมของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย [85] อย่างไรก็ตาม การเตรียมเฟจจะสูญเสียกิจกรรมได้ง่ายหากเก็บไว้อย่างไม่เหมาะสมหรือนานเกินไป [86]

2.5.3.1 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอเฟจในสุกร

ในปัจจุบันมีการนำเฟจมาประยุกต์ใช้ในสุกรมากขึ้นเพื่อทดแทนการให้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ และเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ การทดลองใช้เฟจในสุกรส่วนใหญ่เน้นที่การควบคุมการติดเชื้ออีโคไล และซัลโมเนลลา [87] มีการประยุกต์ใช้เฟจในกระบวนการต่าง ๆ ตั้งแต่ฟาร์มถึงโต๊ะอาหาร (farm to fork) และตั้งแต่ก่อนฆ่าไปจนถึงหลังฆ่าเพื่อควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อในห่วงโซ่อาหาร สำหรับการประยุกต์ใช้เฟจกับสุกรก่อนการฆ่า

(pre-slaughter) จะให้เฟจผ่านทางปากโดยการดื่มน้ำที่มีสารแขวนลอยเฟจ หรือผสมเฟจในอาหาร สัตว์ ส่วนการประยุกต์ใช้เฟจกับสุกรหลังการฆ่า (post slaughter) จะให้เฟจบนซากสุกร และ ระหว่างการบรรจุผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกร [66]

มีงานวิจัยหลายฉบับที่ทดลองใช้เฟจในการรักษา และป้องกันการติดเชื้อซัลโมเนลลาในสุกร ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Gebru และคณะ [88] ได้ทดลองในลูกสุกรอย่างนม (weaned piglets) โดยผสมสารแขวนลอยเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Typhimurium* (3×10^9 PFU) กับอาหารสัตว์ และมีการเสริมโพรไบโอติก (probiotic) คือ *Lactobacillus plantarum* CJLP56 (6.5×10^8 CFU) ลงไป หลังให้เฟจเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ นำ *S. Typhimurium* (5×10^8 CFU/ มิลลิลิตร) ให้กินทางปาก ผลการทดลอง พบว่าสุกรที่ได้รับอาหารที่ผสมกับสารแขวนลอยเฟจและมีการเสริมโพรไบโอติกลงไป ให้ผลดีเช่นเดียวกับการที่สุกรได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *S. Typhimurium* โดยเฉพาะอย่างยิ่งให้ผลดีหลังการให้เชื้อกับสุกร

Wall และคณะ [34] ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเฟจผสม (phage cocktail) ในลูกสุกร ที่มีอายุ 3–4 สัปดาห์ และ สุกรน้ำหนักตามท้องตลาด (น้ำหนักตัวประมาณ 250 ปอนด์) โดยเริ่มจากลูกสุกร ถูกให้เฟจผสมที่ผ่านการห่อหุ้ม (10^9 PFU/มิลลิลิตร) และ *S. Typhimurium* Y4232 (5×10^8 CFU/สุกร) ทางปากผ่านสายยาง เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง พบว่าเฟจผสมเพียงพอต่อการทำให้ปริมาณเชื้อลดลง $2-3 \log_{10}$ CFU หรือประมาณ 99% ในลำไส้เล็กส่วนต้น ต่อมทอนซิล และ กระเพาะลำไส้ใหญ่ (caecum) สำหรับสุกรน้ำหนักตามท้องตลาด เริ่มจากให้ *S. Typhimurium* Y4232 (5×10^9 CFU) ทางปากผ่านสายยาง และทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และมีการให้เฟจผสม (10^9 PFU/มิลลิลิตร) ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง หลัง 6 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเชื้อในกระเพาะลำไส้ใหญ่และลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ลดลง $1-1.5 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร

Hooton และคณะ [89] ได้ทดลองใช้เฟจกับสุกรหลังถูกฆ่า เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อนนำไปขายปลีกทั่วไป โดยใช้เฟจผสม ผสมกับ *S. Typhimurium* U288 ให้ได้ MOI เท่ากับ 0.01–10,000 ทดสอบบนชิ้นหนังหมู เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ที่ MOI 10 และ 1000 สามารถลดเชื้อได้ประมาณ 92% และหลัง 48 ชั่วโมง เชื้อลดลงประมาณ $1.4 \log_{10}$ CFU/4 ตารางเซนติเมตร และหลัง 96 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อลดต่ำกว่าขีดจำกัดที่ตรวจวัดได้

Saez และคณะ [32] ได้ทดสอบ microencapsulated phage cocktail ต่อเชื้อ *S. Typhimurium* ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสุกรที่ได้รับเฟจผ่านทางอาหาร โดยจะให้เฟจทุกวัน เป็นระยะเวลา 5 วัน และในวันที่ 5 กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ให้เฟจทางปากผ่านสายยาง จะได้รับเฟจเช่นเดียวกับกลุ่มแรก และกลุ่มที่ 3 คือกลุ่มควบคุม สุกรทุกกลุ่มจะได้รับ *S. Typhimurium* ผ่านทางปาก และเก็บตัวอย่างอุจจาระทุก 2 ชั่วโมง หลังให้เชื้อ 6 ชั่วโมง สุกรทั้งหมดถูกฆ่า และนำส่วนไส้ติ่ง (cecal) ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) และต่อมน้ำเหลืองในช่องท้อง (mesenteric lymph nodes) มาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อพบว่า ที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง กลุ่มสุกรที่ได้รับเฟจผ่านทางอาหารมีปริมาณเชื้อในอุจจาระคิดเป็น 38.1% และ 42.9% ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มสุกรที่ได้รับเฟจทางปาก คือ 71.4% และ 81.1% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม ที่ 2 ชั่วโมง พบเชื้อในอุจจาระ 71.4% และ 4 ชั่วโมง พบ 85.7% และความหนาแน่นของ *S. Typhimurium* ในส่วนของลำไส้เล็กส่วนปลาย และส่วนไส้ติ่งของสุกรในกลุ่มที่ให้เฟจผ่านทางอาหาร พบ $2.0 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร และ $2.7 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ตรวจพบ $3.0 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร และ $3.7 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Seo และคณะ [33] ได้ทดลองในสุกรที่มีอายุ 4 สัปดาห์ โดยผสม phage cocktail C (SEP-1, SGP-1, STP-1, SS3eP-1, SaTP-2, SchP-1, SAP-1 และ SAP-2 ซึ่งมีความหนาแน่น $\geq 10^9$ PFU/มิลลิลิตร) กับอาหารสัตว์ และให้ *S. Typhimurium* ATCC 14028 (10^8 CFU/มิลลิลิตร) ผ่านทางปากโดยตรง พบว่าสามารถลดเชื้อได้ 100% และลดซิลโมเนลลาที่คัดแยกได้จากมูลสุกร 92.5%

นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้ผลิตภัณฑ์เฟจที่มีจำหน่ายทางการค้าในการลดปริมาณซิลโมเนลลาทั้งก่อนฆ่า และหลังฆ่าสัตว์ ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Sirdesai และคณะ [90] ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ PhageGuard S ซึ่งทดสอบผลิตภัณฑ์เฟจบนเนื้อหมูติดมัน เบคอน และซีโครงหมู โดยเฟจที่ใช้มีความหนาแน่น 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 หรือ 5×10^7 PFU/ตารางเซนติเมตร ทดสอบกับ *Salmonella* Se13 ที่ติดต่อยา streptomycin (2×10^4 CFU/ตารางเซนติเมตร) และบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า สามารถลดเชื้อบนเนื้อหมูติดมันได้ $1.1 \log_{10}$ CFU/ตารางเซนติเมตร และ $1.6 \log_{10}$ CFU/ตารางเซนติเมตร โดยใช้เฟจที่มีความหนาแน่น 1×10^7 และ 5×10^7 PFU/ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ และเมื่อทดสอบบนเบคอน พบว่าเฟจที่มีความหนาแน่นสูงสุด แสดงการลดลงของเชื้อได้ $1.3 \log_{10}$ CFU/ตารางเซนติเมตร ส่วนความหนาแน่นของเฟจที่ต่ำที่สุด สามารถลดประมาณเชื้อได้ $0.8 \log_{10}$ CFU/ตารางเซนติเมตร และซีโครงหมู ที่ความ

หนาแน่นของเฟจ 2×10^7 และ 5×10^7 PFU/กรัม พบการลดลงของเชื้อ $1.3 \log_{10}$ CFU/ตารางเซนติเมตร และ $1.7 \log_{10}$ CFU/ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

จากการศึกษาหลายชิ้นจะเห็นได้ว่า เฟจสามารถลดปริมาณการติดเชื้อซัลโมเนลลาในสุกรได้ และงานวิจัยของ Zeng และคณะ [91] แนะนำให้ใช้แบคทีเรียโอเฟจ 400 มิลลิกรัม ต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม สำหรับลูกสุกรหย่านมที่เลี้ยงด้วยอาหาร โดยอาหารต้องปลอดยาปฏิชีวนะ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต



บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต/จำหน่าย
VC 1 Kb DNA Ladder	Vivantis, USA
VC 100 bp Plus DNA Ladder	Vivantis, USA
6x loading dye	Vivantis, USA
95% ethanol	Alcohol-A, Thailand
Absolute ethanol	RCI Labscan, Thailand
Agar	TM Media, India
Agarose	Vivantis, USA
Chloroform	RCI Labscan, Thailand
di-Potassium hydrogen orthophosphate	Ajax Finechem, USA
DNase I	Panreac, Germany
<i>EcoRI</i> (Restriction enzyme)	Vivantis, USA
<i>EcoRV</i> (Restriction enzyme)	Vivantis, USA
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Fluka, Germany
<i>HinfI</i> (Restriction enzyme)	Vivantis, US
<i>HindIII</i> marker	Vivantis, US
Isoamyl alcohol	Merck, Germany
Lamda DNA	Vivantis, USA
Protinase K	Vivantis, USA
RNase A	Amresco, USA
ViSafe Green Gel Stain	Vivantis, USA
Sodium acetate trihydrate	Himedia, India
Sodium chloride RCI	Labscan, Thailand
Sodium EDTA	Central Drug House, India
Sodium hydroxide	RCI Labscan, Thailand
Sodium dodecyl sulfates (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Tryptone soya broth	Himedia, India

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/จำหน่าย
0.22 μ m PES syringe filter	Membrane solutions, USA
10 mL Syringe	Nipro, Thailand
50 mL Syringe	Nipro, Thailand
Mini Horizontal Gel Electrophoresis	Major Science, Korea
Power supply	Major Science, Korea
เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง	Sartorius, Korea
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Sartorius, Korea
เครื่องปั่นเหวี่ยงตั้งโต๊ะ	Hermle, Germany
เครื่องผลิตน้ำกลั่น	ELGA, UK
เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน	ELGA, UK
เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)	Isolab, Germany
เครื่องมองภาพเจลแบบใช้แสง LED (LED illuminator)	Maestrogen, Taiwan
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Mesulab, China
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Suntex, China
เตาอบไมโครเวฟ	Electrolux, Sweden
ตู้เย็น	Samsung, Korea
ตู้บ่ม (Incubator)	Memmert, Germany
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow carbinet)	Haier, China
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Wisd, Korea
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Tomy, Korea
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath)	Wisd, Korea
อื่น ๆ เช่น autopipette กระจบอกตวง ขวดรูปชมพู่ ขวดใส่ สารเคมี งานเพาะเชื้อ ปีกเกอร์ หลอดทดลอง หลอดปั่นเหวี่ยง เป็นต้น	

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 แบคทีเรีย แบคทีเรียโอเฟจ และสภาวะการเพาะเลี้ยง

แบคทีเรียที่ใช้ทดลองมีทั้งหมด 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับแยกเฟจ ได้แก่ *Salmonella Choleraesuis* KPS585, KPS604-1 และ KPS615 ได้รับมาจากศูนย์ชั้นสูงโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ซึ่งคัดแยกได้จากลำไส้สุกรติดเชื้อ ส่วนการทดสอบ host range ใช้แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 แบคทีเรียถูกเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง trypticase soy agar (TSA) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทดสอบแบคทีเรียทุกสายพันธุ์เลี้ยงในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน การเก็บรักษาเชื้อโดยเก็บในอาหารเหลว TSB ที่มีกลีเซอรอล 20% และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

แบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อซัลโมเนลลาที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร จำนวนทั้งสิ้น 85 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรียโอเฟจที่คัดแยกโดยใช้ *S. Enteritidis* DMST8536 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จำนวน 20 ไอโซเลท *S. Anatum* DMST50705 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จำนวน 10 ไอโซเลท *S. Rissen* DMST7097 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จำนวน 26 ไอโซเลท และ *S. Typhimurium* ATCC13311 DMST562 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จำนวน 29 ไอโซเลท ซึ่งสารแขวนลอยเฟจใน TSB เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลา ด้วยวิธี disk diffusion

นำซัลโมเนลลาทุกสายพันธุ์ (ตารางที่ 1) มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion โดยการทดสอบดำเนินการตามมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) [92] ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ Enrofloxacin (5 µg) Neomycin (30 µg) Colistin Sulphate (10 µg) Sulphamethoxazole (25 µg) Kanamycin (30 µg) และ Gentamicin (10 µg) โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดอาหารเหลว TSB ปริมาตร 4-5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland (1-2 × 10⁸ CFU/มิลลิลิตร) และใช้ไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วป้ายลงบนอาหารจานอาหาร TSA จากนั้นวางแผ่นยา แต่ละชนิดลงบนอาหาร หลังป้ายเชื้อไม่เกิน 15 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง บันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนที่มีการยับยั้งเชื้ออย่างสมบูรณ์ แล้วนำไปเทียบค่า breakpoint อ้างอิง จาก CLSI

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา
<i>Salmonella Choleraesuis</i> KPS585	KU KPS
<i>Salmonella Choleraesuis</i> KPS604-1	KU KPS
<i>Salmonella Choleraesuis</i> KPS615	KU KPS
<i>Salmonella Anatum</i> DMST50705	DMSc
<i>Salmonella Corvallis</i> DMST34495	DMSc
<i>Salmonella Enteritidis</i> DMST8536	DMSc
<i>Salmonella Hadar</i> DMST10634	DMSc
<i>Salmonella Lexington</i> DMST50707	DMSc
<i>Salmonella Rissen</i> DMST7097	DMSc
<i>Salmonella Stanley</i> DMST16874	DMSc
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC13311 DMST562	DMSc
<i>Salmonella Weltevreden</i> DMST15677	DMSc
<i>Salmonella Worthington</i> DMST50712	DMSc

หมายเหตุ: DMSc คือ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; KU KPS คือ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.3.3 การคัดกรองแบคทีเรียโอเฟจในห้องปฏิบัติการที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis*

3.3.3.1 การตรวจหาแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ด้วยวิธี Spot test

ผสม *S. Choleraesuis* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ molten agar (อาหารเหลว TSB ที่มี 0.45% agar) ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร แล้วเทลงบนอาหาร TSA ที่แข็งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 15 นาที เพื่อให้ molten agar แข็งตัว จากนั้นหยดสารแขวนลอยเฟจ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนสนามของแบคทีเรีย แล้วบ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้น โดยกำหนดให้ +++ คือเกิดบริเวณใสชัดเจน ++ คือเกิดบริเวณใสระดับปานกลาง + คือเกิดบริเวณใสระดับต่ำ | คือ เกิดพลาเคต์เดี่ยว และ - คือไม่พบการเปลี่ยนแปลง

3.3.3.2 การตรวจสอบแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ด้วยวิธี double layer agar

ผสม *S. Choleraesuis* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ molten agar ปริมาตร 3.5 มิลลิตร จากนั้นเจือจางสารแขวนลอยเฟจใน SM buffer ให้ได้ความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงบนอาหาร TSA หมุนวนจนเพาะเชื้อเพื่อให้ผสมเข้ากัน และกระจายทั่วผิวน้ำอาหารแข็ง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ molten agar แข็งตัว จากนั้นนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกขนาดของพลาค และตรวจดูลักษณะของพลาคที่เกิดขึ้น (ชุนหรือใส)

3.3.4 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอเฟจ

ทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอเฟจด้วยวิธี double layer agar โดยเลือกเจาะพลาคที่มีลักษณะและขนาดที่แตกต่างกัน โดยใช้ที่ปัดปลายปราศจากเชื้อ เจาะขึ้นวุ้นบริเวณที่มีพลาค และกระจายใน SM buffer ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้แบคทีเรียโอเฟจแพร่ออกมาจากชั้นวุ้น จากนั้นนำสารแขวนลอยเฟจที่ได้ไปทำ double layer agar ทำซ้ำในขั้นตอนทั้งหมดที่กล่าวมาอย่างน้อย 5 รอบ เพื่อให้มั่นใจว่าเฟจบริสุทธิ์ โดยสังเกตจากการเกิดพลาคที่มีลักษณะและขนาดสม่ำเสมอบนอาหารแข็ง

3.3.5 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโอเฟจ

นำแบคทีเรียโอเฟจที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในข้อ 3.3.4 มาทำ double layer agar โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมชุดอาหารวุ้นอ่อนชั้นบนที่มีพลาคหนาแน่น จากนั้นถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยงปราศจากเชื้อ และเทอาหารเหลว TSB ปริมาตร 3 มิลลิตร ลงบนผิวน้ำอาหารแข็งเดิม ชุดวุ้นอ่อนที่เหลือ แล้วถ่ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยงหลอดเดิม ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000g เป็นเวลา 20 นาที นำของเหลวเหนือตะกอนกรองด้วย syringe filter polyethersulfone membrane (PES) วัสดุกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเฟจ (PFU/มิลลิลิตร) ด้วยวิธี double layer agar และคำนวณหาความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจได้จาก ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจ (PFU/มิลลิลิตร) = จำนวนพลาค × ระดับการเจือจาง / ปริมาตรที่ใช้ทดสอบ (มิลลิลิตร)

3.3.6 การคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* จากตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำจากคลองชลประทาน สระแก้ว สระบัว และน้ำทิ้งจากท่อระบายน้ำของโรงฆ่าสัตว์ ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000g

เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนอนุภาคขนาดใหญ่ แล้วนำส่วนใสที่ได้ (supernatant) ผสมกับ เซลล์เจ้าบ้าน (*S. Choleraesuis* KPS585, KPS604-1 และ KPS615) และอาหารเลี้ยงเชื้อ 10X TSB ในอัตราส่วน 9:0.1:1 โดยเตรียมปริมาตรรวม 30 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500g เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใสที่ได้ด้วย syringe filter polyethersulfone membrane (PES) ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วทดสอบ การมีอยู่ของเฟจในตัวอย่างด้วยวิธี spot test

3.3.7 ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis*

3.3.7.1 การศึกษาช่วงของเซลล์เจ้าบ้านของแบคทีเรียโอเฟจ (host range test)

การทดสอบช่วงของเซลล์เจ้าบ้านของเฟจ ด้วยวิธี spot test โดยเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1 เตรียมสไลม์แบคทีเรีย โดยผสมแบคทีเรียที่เลี้ยงข้ามคืนในอาหาร TSB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ molten agar ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร แล้วเทลงบนอาหาร TSA ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง ประมาณ 15 นาที เพื่อให้ molten agar แข็งตัว จากนั้นหยดสารแขวนลอยเฟจ 10 ไมโครลิตร ลงบนสไลม์ของแบคทีเรีย ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้หยดน้ำแห้ง นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นและบันทึกผล

3.3.7.2 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจสำหรับทำลายเซลล์โมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ

(efficiency of plating, EOP)

ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายเซลล์โมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ (ตารางที่ 1) ด้วยวิธี double layer agar ซึ่งคำนวณค่า EOP ได้จากสูตร $EOP = \frac{\text{ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจที่ได้จากการทดสอบกับเซลล์แบคทีเรียอื่น}}{\text{ความหนาแน่นของแบคทีเรียโอเฟจที่ได้จากการทดสอบกับเซลล์เจ้าบ้าน}}$

3.3.7.3 ศึกษาความเสถียรของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การศึกษาค่าผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเฟจ ซึ่งทดสอบในอาหารเหลว TSB โดย นำอาหารเหลว TSB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิตดสอบก่อน (pre-incubated) ได้แก่ 28, 37, 45 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผสมสารแขวนลอยเฟจ (ความหนาแน่นเริ่มต้น 10^6 - 10^7 PFU/มิลลิลิตร) ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิตดสอบ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังบ่มนำตัวอย่างมาเจือจางใน SM buffer ทันที และนำไปตรวจสอบ

ความหนาแน่นของเฟจด้วยวิธี double layer agar และนำมาหาค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นเฟจจากการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของเฟจเริ่มต้น

3.3.7.4 ศึกษาความเสถียรของแบคทีเรียโอเฟจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ที่ pH ต่ำ ในสภาวะของเหลวกระเพาะอาหารจำลอง (simulated gastric fluid, SGF)

การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของเฟจถูกทดสอบใน SGF ซึ่งเตรียมสภาวะของเหลวในกระเพาะอาหารจำลองตามวิธีของ Berardi และคณะ [93] ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 34 มิลลิโมลาร์ และเพปซิน (pepsin) 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปรับด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCL) ให้ได้ pH 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 โดยบ่ม SGF ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการทดสอบ (pre-incubated) จากนั้นนำสารแขวนลอยเฟจ (ความหนาแน่นเริ่มต้น 10^9 PFU/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน SGF และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง หลังบ่มตรวจสอบความหนาแน่นของเฟจด้วยวิธี double layer agar และนำมาหาค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นเฟจจากการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของเฟจเริ่มต้น

3.3.7.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM)

เตรียมแบคทีเรียโอเฟจความหนาแน่นสูง ($\geq 10^9$ PFU/มิลลิลิตร) และหยดลงบนตะแกรงทองแดงเคลือบฟอรัมวาร (Formvar coated copper grid) จากนั้นปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และย้อมด้วย 2% uranyl acetate เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Hitachi Hightech รุ่น HT7700 (Hitachi, ประเทศญี่ปุ่น) ที่แรงดันเร่ง 80 keV (ณ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) ตรวจสอบขนาดของแบคทีเรียโอเฟจจากค่าเฉลี่ยของการวัดขนาดอย่างน้อย 10 อนุภาค

3.3.8 ศึกษาจีโนมแบคทีเรียโอเฟจด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

ผสมแบคทีเรียโอเฟจความหนาแน่นสูง (10^9 PFU/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับ DNase I ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร

12.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอะซีติก (EDTA) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ เอนไซม์โปรตีนเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร รวมทั้งเติม 10% ของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และเติมฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มี อยู่ ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,300g เป็นเวลา 10 นาที และถ่ายส่วนใสด้านบนไปยังหลอดใหม่ จากนั้นเติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute ethanol) ปริมาตร 2.5 เท่าของส่วนใส และโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ที่ pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 11,300g เป็น เวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทั้งตะกอนให้แห้ง และละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนปลอด เชื้อ

ตรวจสอบจีโนมของเฟจที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในบัฟเฟอร์ 1X TAE พร้อมเติมสีย้อม ViSafe Green Gel ลงไปตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นให้ กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาส่องด้วยเครื่อง LED transluminator สำหรับการเปรียบเทียบขนาดของกรดนิวคลีอิก ใช้ Lamda DNA/*Hind*III marker, VC 100bp Plus และ VC 1kb Marker เป็นสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน นำจีโนมที่ได้มา ศึกษาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Eco*RI, *Eco*RV และ *Hin*FI โดยสภาวะที่ใช้ในการตัด กรดนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์เหล่านี้ได้ทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ จากนั้นตรวจสอบ รูปแบบจีโนมของแบคทีริโอเฟจที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1x TAE บัฟเฟอร์ ใช้ศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 40-45 นาที

3.3.9 ศึกษาประสิทธิภาพของเฟจต่อการฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสภาวะของเหลวลำไส้จำลอง (simulated intestinal fluid, SIF)

เตรียมของเหลวลำไส้จำลอง ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin) 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเกลือน้ำดี (bile salt) 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายในสารละลาย ไตโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี pH 6.8 [94] เตรียม

สารแขวนลอยเฟจโดยเจือจางเฟจแต่ละไอโซเลท และเฟจผสมทั้ง 3 ไอโซเลท (vB_SCh-RP5i3B, vB_SCh-RP60i4A และ vB_SCh-RP61i4) ใน SM buffer ให้ความหนาแน่นสุดท้ายคือ 10^7 และ 10^8 PFU/มิลลิลิตร และเตรียม *S. Choleraesuis* แต่ละสายพันธุ์ (KPS585, KPS604-1 และ KPS615) ให้มีความหนาแน่นสุดท้ายเท่ากับ 10^7 CFU/มิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อแต่ละสายพันธุ์ผสมกับเฟจเดี่ยว หรือเฟจผสม ให้ได้ MOI เท่ากับ 1 และ 10 ในปริมาตร 30 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทุก 10 นาที เป็นระยะเวลา 120 นาที สำหรับกลุ่มควบคุม จะใช้ SM buffer แทนเฟจ ตรวจสอบความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างโดยการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.9% w/v (NaCl) และหยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติดำเนินการโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 23 เปรียบเทียบความเสถียรของเฟจที่อุณหภูมิต่าง ๆ ระหว่างความหนาแน่นเฟจเริ่มต้น และความหนาแน่นเฟจหลังบ่ม 1 ชั่วโมง ด้วย t-test นอกจากนี้ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) เพื่อประเมินความแตกต่างของความเสถียรของเฟจที่อุณหภูมิต่างกัน ความเสถียรของเฟจหลังจากการสัมผัสที่ pH ต่ำเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง และการลดลงของแบคทีเรียหลังการบำบัดด้วยเฟจที่ MOI ต่างกัน ในแต่ละจุดเวลา การวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง (Two-way ANOVA) ถูกใช้เพื่อประเมินผลของ pH เวลา และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง pH และเวลาต่อความเสถียรของเฟจที่ pH ต่ำ เปรียบเทียบผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ด้วยการทดสอบ Turkey's Honestly Significant Different (HSD) ทั้งนี้การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลา

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลาทั้งหมด 13 สายพันธุ์ ซึ่งทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด (ตารางที่ 2) พบว่า ซัลโมเนลลาทุกสายพันธุ์มีความไวต่อ Colistin sulphate (10 µg) และสายพันธุ์ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะมากที่สุด คือ *S. Choleraesuis* KPS615 ซึ่งไวต่อยา 3 ชนิด ได้แก่ enrofloxacin (5 µg) neomycin (30 µg) และ kanamycin (30 µg) และพบซัลโมเนลลา 3 สายพันธุ์ไวต่อยา neomycin ในระดับปานกลาง ได้แก่ *S. Choleraesuis* KPS604-1, *S. Corvallis* และ *S. Worthington* ส่วน *S. Choleraesuis* KPS585 และ *S. Worthington* ไวต่อยาเพียง 1 ชนิด คือ gentamicin (10 µg) และ Sulphamethoxazole (25 µg) ตามลำดับ ตารางที่ 2 ผลทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของซัลโมเนลลา

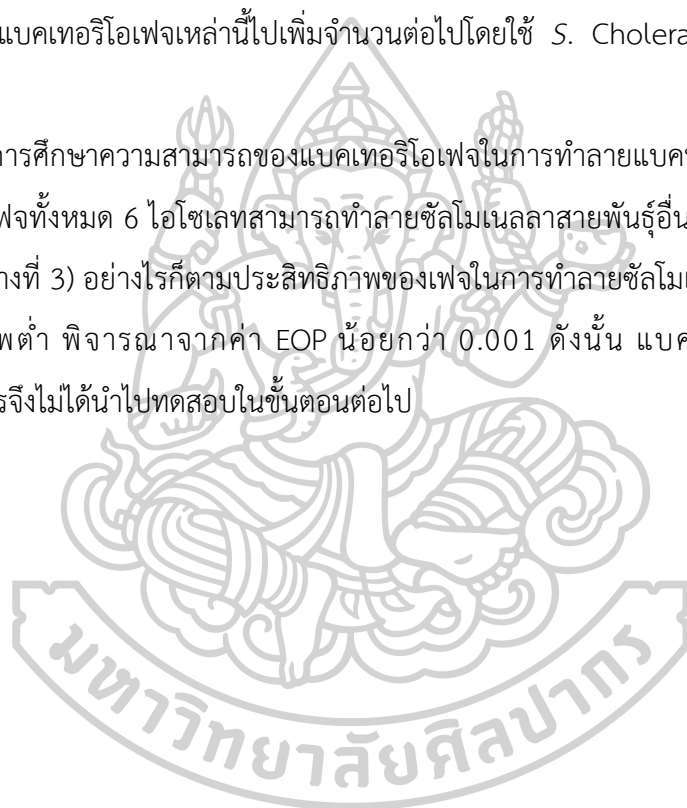
สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ยาปฏิชีวนะ					
	GEN (10 µg)	ENR (5 µg)	CST (10 µg)	SXT (25 µg)	NEO (30 µg)	KAN (30 µg)
<i>S. Choleraesuis</i> KPS585	R	S	S	S	S	S
<i>S. Choleraesuis</i> KPS604-1	S	S	S	S	I	S
<i>S. Choleraesuis</i> KPS615	S	R	S	S	R	R
<i>S. Anatum</i>	S	S	S	S	S	S
<i>S. Corvallis</i>	S	S	S	S	I	S
<i>S. Enteritidis</i>	S	S	S	S	S	S
<i>S. Hadar</i>	S	S	S	S	S	S
<i>S. Lexington</i>	S	S	S	S	S	S
<i>S. Rissen</i>	S	S	S	S	S	S
<i>S. Stanley</i>	S	S	S	S	S	S
<i>S. Typhimurium</i>	S	S	S	S	S	S
<i>S. Weltevreden</i>	S	S	S	S	S	S
<i>S. Worthington</i>	S	S	S	R	I	S

หมายเหตุ: GEN คือ Gentamicin, ENR คือ Enrofloxacin, CST คือ Colistin Sulphate, SXT คือ Sulphamethoxazole, NEO คือ Neomycin และ KAN คือ Kanamycin S (susceptible) คือ ไวต่อยาปฏิชีวนะ I (intermediate) คือ ไวต่อยาในระดับปานกลาง และ R (resistant) คือ ไวต่อยาปฏิชีวนะ

4.2 ผลคัดกรองแบคทีเรียโอฟาจที่มีในห้องปฏิบัติการที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis*

ผลคัดกรองแบคทีเรียโอฟาจทั้งหมด 85 ไอโซเลทที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ พบ 14 ไอโซเลทที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยปรากฏโซนใสบนสนามของเซลล์แบคทีเรีย และผลตรวจสอบลักษณะและขนาดของพลาค ด้วยวิธี double layer agar พบ 6 ไอโซเลทสร้างพลาคใส (clear plaque) และมีขนาดพลาคน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ได้แก่ เฟจ vB_SAn-RN8i2, vB_SAn-RN24i2, vB_SAn-RN69, vB_SRI-RN14i1, vB_STy-RN20 และ vB_STy-RN21i2 (ตารางที่ 3) ซึ่งแบคทีเรียโอฟาจที่สร้างพลาคใสนี้อาจจัดเป็นแบคทีเรียโอฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบไลติก ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียโอฟาจเหล่านี้ไปเพิ่มจำนวนต่อไปโดยใช้ *S. Choleraesuis* KPS604-1 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอฟาจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่าแบคทีเรียโอฟาจทั้งหมด 6 ไอโซเลทสามารถทำลายเซลล์โมเนลลาสายพันธุ์อื่นได้ นอกเหนือจากเซลล์เจ้าบ้าน (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเฟจในการทำลายเซลล์โมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ มีประสิทธิภาพต่ำ พิจารณาจากค่า EOP น้อยกว่า 0.001 ดังนั้น แบคทีเรียโอฟาจที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการจึงไม่ได้นำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป



ตารางที่ 3 ช่วงของเซลล์เจ้าบ้าน (host range) และประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจในการเข้าทำลาย (EOP) ซีลีนเนลลาสายพันธุ์อื่น

แบคทีเรียโอเฟจ	ลักษณะ; ขนาดพลาต	Host range (ค่า EOP) ของแบคทีเรียโอเฟจต่อสายพันธุ์ของแบคทีเรีย															
		S. Choleraesuis KPS585	S. Choleraesuis KPS604-1	S. Choleraesuis KPS615	S. Anatum	S. Corvallis	S. Enteritidis	S. Hadar	S. Lexington	S. Rissen	S. Stanley	S. Typhimurium	S. Weltevreden	S. Worthington			
vB_SAn-RN1i3	พลาตขุ่น; < 1 มม.	-	-	-	Host	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_SAn-RN8i2	พลาตใส; < 1 มม.	+	+	+	Host	+	(< 0.001)	(< 0.001)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_SAn-RN19	พลาตขุ่น; 1 มม.	-	-	-	Host	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_SAn-RN24i2	พลาตใส; < 1 มม.	+	+	+	Host	+	(< 0.001)	(< 0.001)	+	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : +++ คือ เกิดบริเวณใสชัดเจน, ++ เกิดบริเวณใสชัดปานกลาง, + คือ เกิดบริเวณใสชัดเจน, - คือ ไม่เกิดบริเวณใส

EOP มากกว่า 0.5 คือ เฝมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบสูง, EOP อยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.5 คือ เฝมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบปานกลาง

EOP 0.001 ถึง 0.2 คือ เฝมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบต่ำ, EOP น้อยกว่า 0.001 คือ เฝไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบ

- คือ เฝไม่สามารถติดเชื้อทดสอบได้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

แบคทีเรียโอเฟจ	ลักษณะ; ขนาดพลาซิด	Host range (ค่า EOP) ของแบคทีเรียโอเฟจต่อสายพันธุ์ของแบคทีเรีย																
		S. Choleraesuis KPS585	S. Choleraesuis KPS604-1	S. Choleraesuis KPS615	S. Anatum Host	S. Corvallis	S. Enteritidis	S. Hadar	S. Lexington	S. Rissen	S. Stanley	S. Typhimurium	S. Weltevreden	S. Worthington				
vB_SAN-RN69	พลาซิด; < 1 มม.	-	+	+	Host	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
vB_SRI-RN14i1	พลาซิด; < 1 มม.	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_SRI-RN33	พลาซิด; 1 มม.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_SRI-RN34	พลาซิด; 1 มม.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: +++ คือ เกิดบริเวณไส้ชัดเจน, ++ เกิดบริเวณไส้ชัดเจนปานกลาง, + คือ เกิดบริเวณไส้ไม่ชัดเจน, - คือ ไม่เกิดบริเวณไส้

EOP มากกว่า 0.5 คือ เพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบสูง, EOP อยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.5 คือ เพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบปานกลาง

EOP 0.001 ถึง 0.2 คือ เพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบต่ำ, EOP น้อยกว่า 0.001 คือ เพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบ

- คือ เพิ่มประสิทธิภาพการทดสอบได้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

แบคทีเรียโอเฟจ	ลักษณะ; ขนาดพลาซมิด	Host range (ค่า EOP) ของแบคทีเรียโอเฟจต่อสายพันธุ์ของแบคทีเรีย																						
		S. Choleraesuis KPS585	S. Choleraesuis KPS604-1	S. Choleraesuis KPS615	S. Anatum	S. Corvallis	S. Enteritidis	S. Hadar	S. Lexington	S. Rissen	S. Stanley	S. Typhimurium	S. Weltevreden	S. Worthington										
vB_SRI-RN35i2	พลาซมิด; 1 มม.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
vB_SRI-RN42i1	พลาซมิด; 1 มม.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_SRI-RN50	พลาซมิด; 1 มม.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_STy-RN20	พลาซมิด; <1 มม.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: +++ คือ เกิดบริเวณไส้ชัดเจน, ++ เกิดบริเวณไส้ชัดเจนปานกลาง, + คือ เกิดบริเวณไส้ชัดเจน, - คือ ไม่เกิดบริเวณไส้

EOP มากกว่า 0.5 คือ เภมมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบสูง, EOP อยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.5 คือ เภมมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบปานกลาง

EOP 0.001 ถึง 0.2 คือ เภมมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบต่ำ, EOP น้อยกว่า 0.001 คือ เภมไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบ

- คือ เภมไม่สามารถติดเชื้อทดสอบได้

ตารางที่ 3 (ต่อ)

แบคทีเรียโอเฟจ	ลักษณะ; ขนาดพลาซมิด	Host range (ค่า EOP) ของแบคทีเรียโอเฟจต่อสายพันธุ์ของแบคทีเรีย															
		S. Choleraesuis KPS585	S. Choleraesuis KPS604-1	S. Choleraesuis KPS615	S. Anatum	S. Corvallis	S. Enteritidis	S. Hadar	S. Lexington	S. Rissen	S. Stanley	S. Typhimurium	S. Weltevreden	S. Worthington			
vB_STy-RN21i2	พลาซมิด; <1 มม.	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
vB_STy-RN25i1	พลาซมิด; <1 มม.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

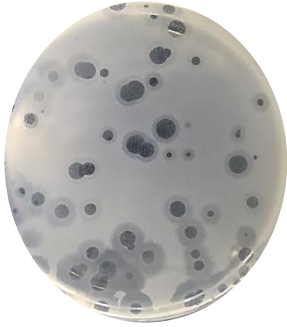
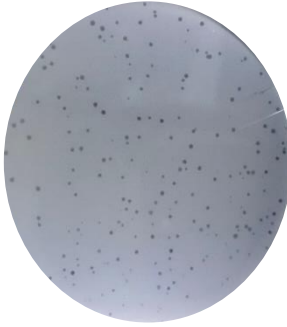
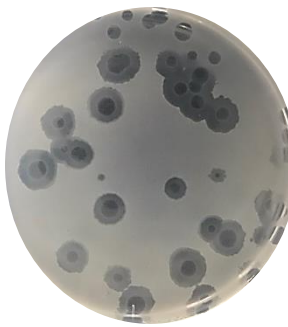
หมายเหตุ: +++ คือ เกิดบริเวณใสชัดเจน, ++ เกิดบริเวณใสชัดเจนปานกลาง, + คือ เกิดบริเวณใสไม่ชัดเจน, - คือ ไม่เกิดบริเวณใส
 EOP มากกว่า 0.5 คือ เพิ่มมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบสูง, EOP อยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.5 คือ เพิ่มมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบปานกลาง
 EOP 0.001 ถึง 0.2 คือ เพิ่มมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบต่ำ, EOP น้อยกว่า 0.001 คือ เพิ่มไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบ
 - คือ เพิ่มสามารถติดเชื้อทดสอบได้

4.3 ผลคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* จากตัวอย่างน้ำ


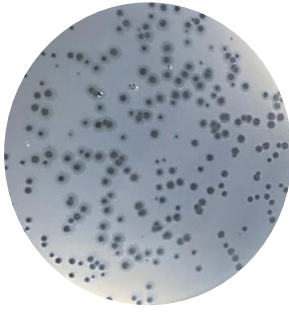
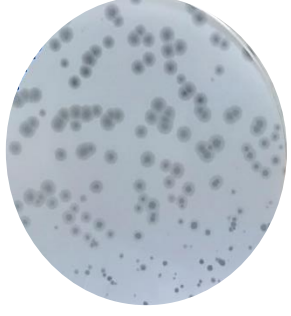
การคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจจากตัวอย่างน้ำทั้งหมด 4 ตัวอย่าง โดยใช้ *S. Choleraesuis* KPS585, KPS604-1 และ KPS615 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (ตารางที่ 4) พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ได้ 2 ตัวอย่าง โดยสังเกตจากพลาไคที่ปรากฏบนอาหารแข็ง และภายหลังจากทำบริสุทธีเฟจสามารถคัดแยกแบคทีเรียโอฟาจได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท โดยแบ่งออกเป็น แบคทีเรียโอฟาจที่คัดแยกได้จากคลองชลประทานจำนวน 6 ไอโซเลท และน้ำทิ้งจากท่อระบายน้ำโรงฆ่าสัตว์จำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งเฟจแต่ละไอโซเลทสร้างพลาไคใส และมีขอบชุ่นล้อมรอบ (halo) ขนาดแตกต่างกัน โดยเฉลี่ยประมาณน้อยกว่า 1 ถึง 4 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4)



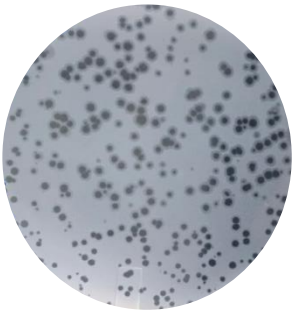
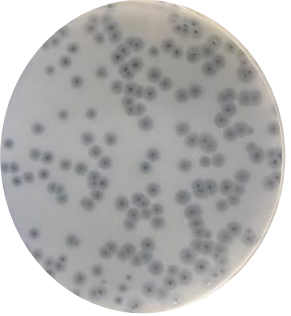
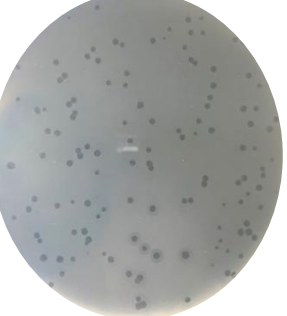
ตารางที่ 4 แบคทีเรียโอเพกที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* และลักษณะของพลาทที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ

แหล่งตัวอย่าง	เซลล์เจ้าบ้าน	ลักษณะ และขนาดพลาท	แบคทีเรียโอเพก	ลักษณะพลาทที่ปรากฏบนสไลด์ของแบคทีเรีย
คลองชลประทาน	<i>S. Choleraesuis</i> KPS585	พลาทใส มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาด 4 มิลลิเมตร	vB_SCh-RP5i3A	
คลองชลประทาน	<i>S. Choleraesuis</i> KPS585	พลาทใส มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาดน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร	vB_SCh-RP5i3B	
คลองชลประทาน	<i>S. Choleraesuis</i> KPS604-1	พลาทใส มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาด 4 มิลลิเมตร	vB_SCh-RP60i3A	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่งตัวอย่าง	เซลล์เจ้าบ้าน	ลักษณะ และขนาดพลาท	แบคทีเรียเฟจ	ลักษณะพลาทที่ปรากฏบนสนามของแบคทีเรีย
คลองชลประทาน	S. Choleraesuis KPS604-1	พลาทใส มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาด 1.5 มิลลิเมตร	vB_SCh-RP6013B	
คลองชลประทาน	S. Choleraesuis KPS604-1	พลาทใส มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาด 1 มิลลิเมตร	vB_SCh-RP6013C	
คลองชลประทาน	S. Choleraesuis KPS615	พลาทใส มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาด 3 มิลลิเมตร	vB_SCh-RP6113	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่งตัวอย่าง	เซลล์เจ้าบ้าน	ลักษณะ และขนาดพลาค	แบคทีเรียโอเฟจ	ลักษณะพลาคที่ปรากฏบนสไลด์ของแบคทีเรีย
น้ำทิ้งจากท่อระบาย น้ำโรงฆ่าสัตว์	<i>S. Choleraesuis</i> KPS615	พลาคใส มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาด 2 มิลลิเมตร	VB_SCh-RP61iA	
น้ำทิ้งจากท่อระบาย น้ำโรงฆ่าสัตว์	<i>S. Choleraesuis</i> KPS604-1	พลาคใส มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาด 3 มิลลิเมตร	VB_SCh-RP60iA	
น้ำทิ้งจากท่อระบาย น้ำโรงฆ่าสัตว์	<i>S. Choleraesuis</i> KPS604-1	พลาคใส มีขอบขุ่นล้อมรอบ ขนาด 1.5 มิลลิเมตร	VB_SCh-RP60iB	

4.4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอเฟจสำหรับทำลายซัลโมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ (efficiency of plating, EOP)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเฟจสำหรับทำลายซัลโมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียโอเฟจที่คัดแยกได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) เฟจ vB_SCh-RP5i3B และ vB_SCh-RP61i4 มีประสิทธิภาพสูงในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (EOP > 0.5) 3 สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ โดยเฟจ vB_SCh-RP5i3B มีประสิทธิภาพสูงในการติดเชื้อ *S. Choleraesuis* KPS604-1, KPS 615 และ *S. Rissen* (EOP > 0.5) แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการติดเชื้อ *S. Hadar* (EOP < 0.001) และ vB_SCh-RP61i4 มีประสิทธิภาพสูงในการติดเชื้อ *S. Choleraesuis* KPS585, KPS604-1 และ *S. Rissen* (EOP > 0.5) ส่วนเฟจที่เหลือ 7 ไอโซเลท ได้แก่ vB_SCh-RP5i3A, vB_SCh-RP60i3A, vB_SCh-RP60i3B, vB_SCh-RP60i3C, vB_SCh-RP60i4A, vB_SCh-RP60i4B และ vB_SCh-RP61i3 มีประสิทธิภาพสูงในการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นเพียง 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 5



ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของแบบทดสอบไอเฟจในการเข้าทำลาย (EOP) ซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่น

แบบทดสอบไอเฟจ	ค่า EOP												
	S. Choleraesuis KPS585	S. Choleraesuis KPS604-1	S. Choleraesuis KPS615	S. Anatum	S. Corvallis	S. Enteritidis	S. Hadar	S. Lexington	S. Rissen	S. Stanley	S. Typhimurium	S. Weltevreden	S. Worthington
vB_SCh-RP5i3A	Host	0.427	0.501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_SCh-RP5i3B	Host	5.682	2.338	-	-	-	< 0.001	-	0.528	-	-	-	-
vB_SCh-RP6i3A	0.941	Host	0.066	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_SCh-RP6i3B	0.003	Host	0.155	-	-	-	-	-	0.034	-	-	-	-
vB_SCh-RP6i3C	0.026	Host	0.827	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vB_SCh-RP6i4A	0.023	Host	2.240	-	-	-	-	-	0.029	-	-	-	-
vB_SCh-RP6i4B	-	Host	1.189	-	-	-	-	-	0.470	-	-	-	-
vB_SCh-RP6i1i3	0.051	6.860	Host	-	-	-	-	-	0.059	-	-	-	-
vB_SCh-RP6i1i4	0.739	1.113	Host	-	-	-	-	-	1.959	-	-	-	-

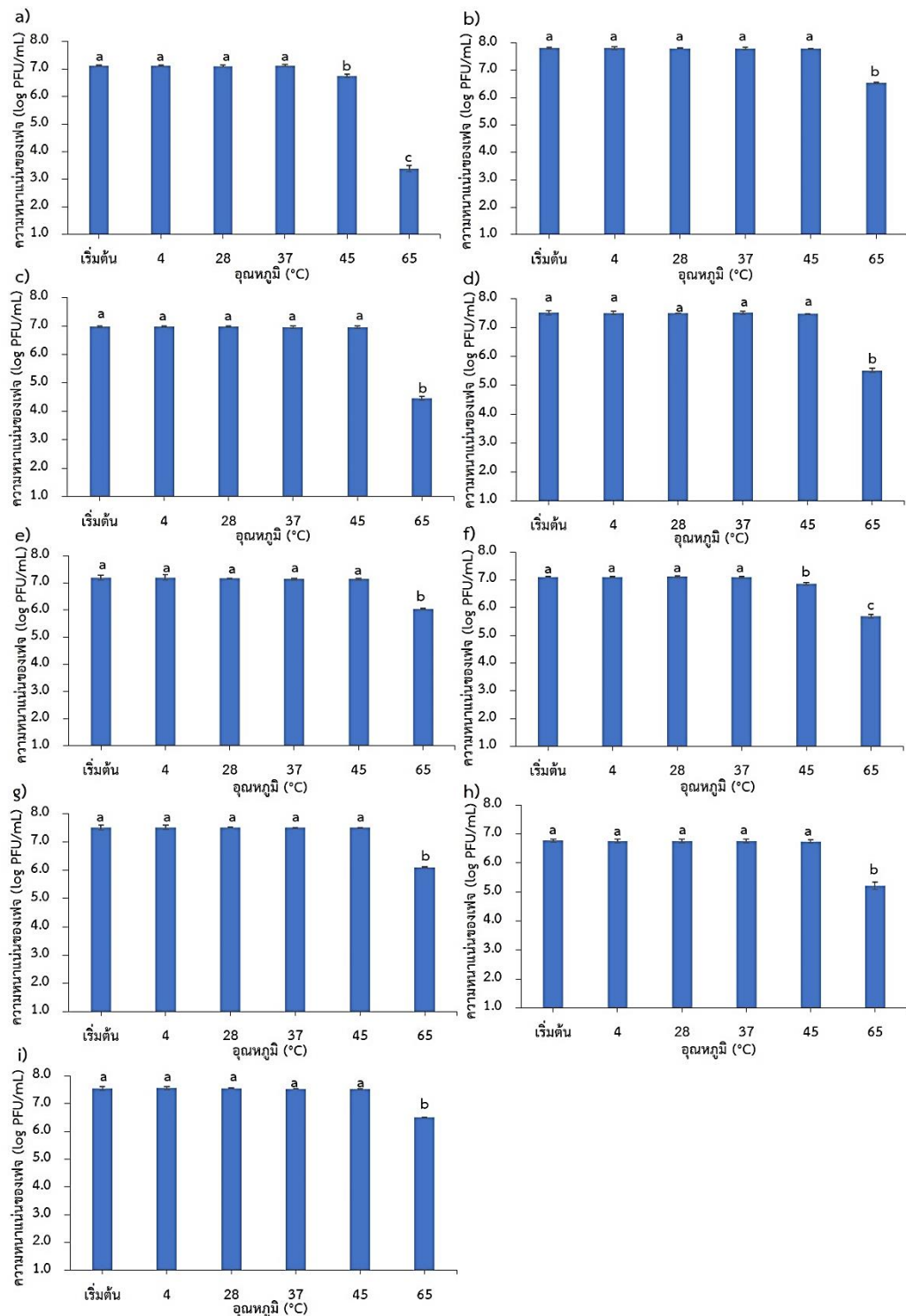
หมายเหตุ : EOP มากกว่า 0.5 คือ เฝจมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบสูง; EOP อยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.5 คือ เฝจมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบปานกลาง; EOP 0.001 ถึง 0.2 คือ เฝจมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบต่ำ; EOP น้อยกว่า 0.001 คือ เฝจไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทดสอบ

- คือ เฝจไม่สามารถติดเชื้อทดสอบได้

4.5 ความเสถียรของแบคทีเรียโอเฟจที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการทดสอบความเสถียรของเฟจที่อุณหภูมิ 4, 28, 37, 45 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) พบว่าเฟจทั้ง 9 ไอโซเลท สามารถอยู่รอดได้ในช่วงอุณหภูมิ 4 ถึง 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของเฟจ vB_SCh-RP5i3A ลดลง $0.37 \pm 0.08 \log \text{PFU/มิลลิลิตร}$ ($t_5 = 11.776, p < 0.001$) ในขณะที่ความหนาแน่นของเฟจ vB_SCh-RP60i4A ลดลง $0.25 \pm 0.04 \log \text{PFU/มิลลิลิตร}$ ($t_5 = 13.922, p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นเฟจเริ่มต้น และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของเฟจทุกไอโซเลทลดลงอย่างมีนัยสำคัญประมาณ $1.03\text{--}3.73 \log \text{PFU/มิลลิลิตร}$ ($p < 0.001$)



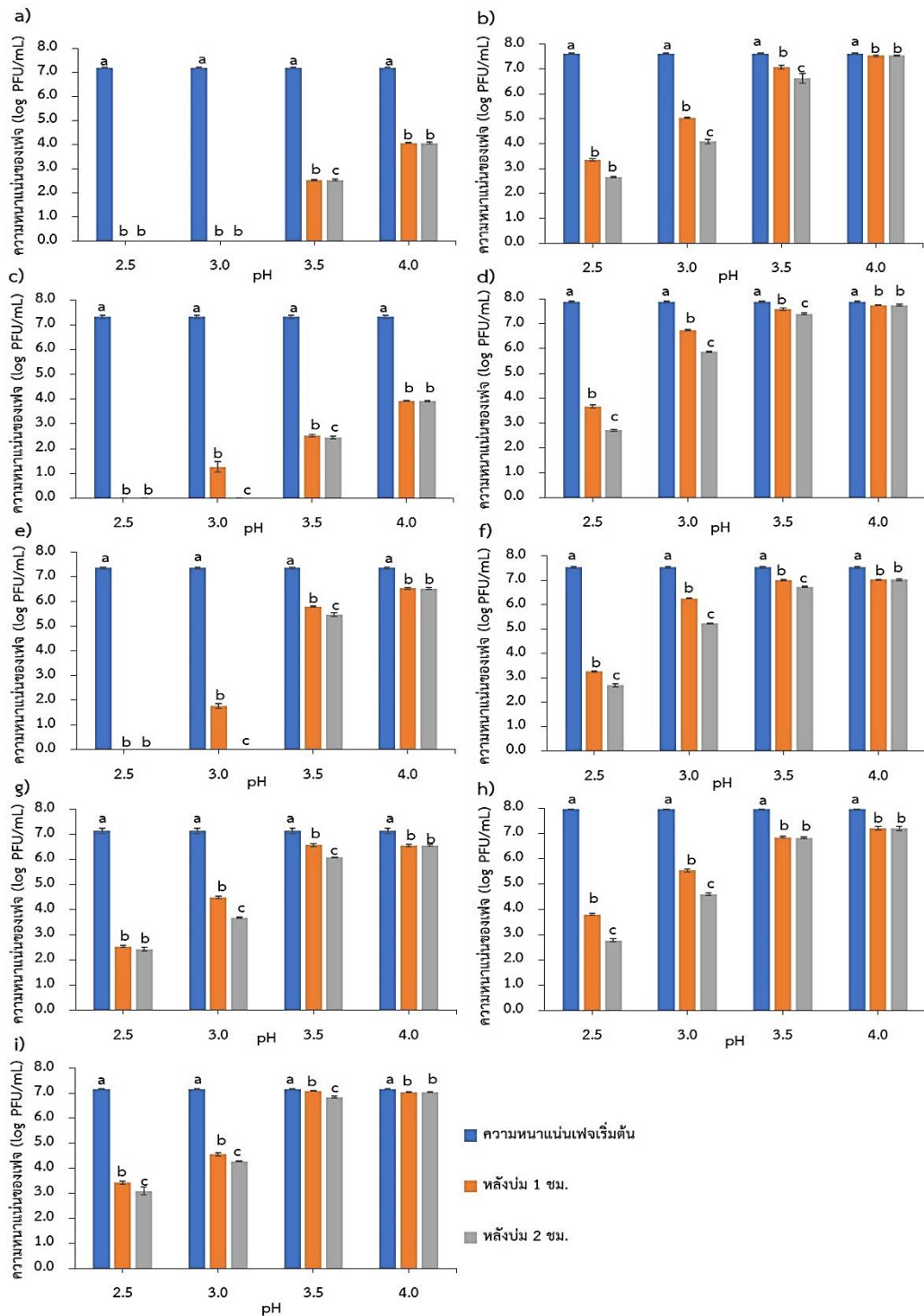


ภาพที่ 3 ความเสถียรของเฟจที่อุณหภูมิ 4, 28, 37, 45 และ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (a) vB_Sch-RP5i3A (b) vB_Sch-RP5i3B (c) vB_Sch-RP60i3A (d) vB_Sch-RP60i3B (e) vB_Sch-RP60i3C (f) vB_Sch-RP60i4A (g) vB_Sch-RP60i4B (h) vB_Sch-RP61i3 และ (i) vB_Sch-RP61i4 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD สำหรับการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ตัวอักษรที่แตกต่างกัน เนื้อแท่งกราฟ บ่งบอกถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

4.6 ความเสถียรของแบคทีเรียโอเฟจที่ pH ต่ำ ในสถานะของเหลวกระเพาะอาหารจำลอง (simulated gastric fluid, SGF)

จากการศึกษาความเสถียรของเฟจที่ pH ต่ำ ในสถานะของเหลวกระเพาะอาหารจำลอง เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 4) พบว่า pH ($F_{3,60} = 101685.15, p < 0.001$) เวลา ($F_{2,60} = 752870.03, p < 0.001$) และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง pH และ เวลา ($F_{6,60} = 25480.39, p < 0.001$) มีผลต่อความหนาแน่นของเฟจอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าเฟจ vB_SCh-RP5i3A มีความไวต่อ pH 2.5 และ 3.0 โดยไม่พบการมีชีวิตของเฟจภายใน 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 4a) นอกจากนี้ ความหนาแน่นของเฟจลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังบ่มที่ pH 3.5–4.0 เป็นเวลา 1–2 ชั่วโมง ($p < 0.001$) ในทำนองเดียวกันไม่สามารถตรวจพบเฟจ vB_SCh-RP60i3A และ vB_SCh-RP60i3C ที่ pH 2.5 ภายใน 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม เฟจ vB_SCh-RP60i3A และ vB_SCh-RP60i3C มีความเสถียรมากกว่าเฟจ vB_SCh-RP5i3A คือยังคงมีชีวิตรอดใน pH 3.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าหลังบ่ม 2 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบเฟจทั้งสองชนิดแล้ว ส่วนเฟจที่เหลืออีก 6 ไอโซเลท (vB_SCh-RP5i3B, vB_SCh-RP60i3B, vB_SCh-RP60i4A, vB_SCh-RP60i4B, vB_SCh-RP61i3 และ vB_SCh-RP61i4) ยังคงมีชีวิตรอดที่ pH 2.5–4.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แม้จะพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4b, d, f, g, h และ i)





ภาพที่ 4 ความเสถียรของเฟจที่ pH ต่ำใน SGF เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง (a) vB_Sch-RP5i3A (b) vB_Sch-RP5i3B (c) vB_Sch-RP60i3A (d) vB_Sch-RP60i3B (e) vB_Sch-RP60i3C (f) vB_Sch-RP60i4A (g) vB_Sch-RP60i4B (h) vB_Sch-RP61i3 (i) vB_Sch-RP61i4 ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD สำหรับการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันเหนือแท่งกราฟระบุถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความหนาแน่นเฟจเริ่มต้น และหลังบ่มที่แต่ละ pH ของเฟจแต่ละไอโซเลท โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

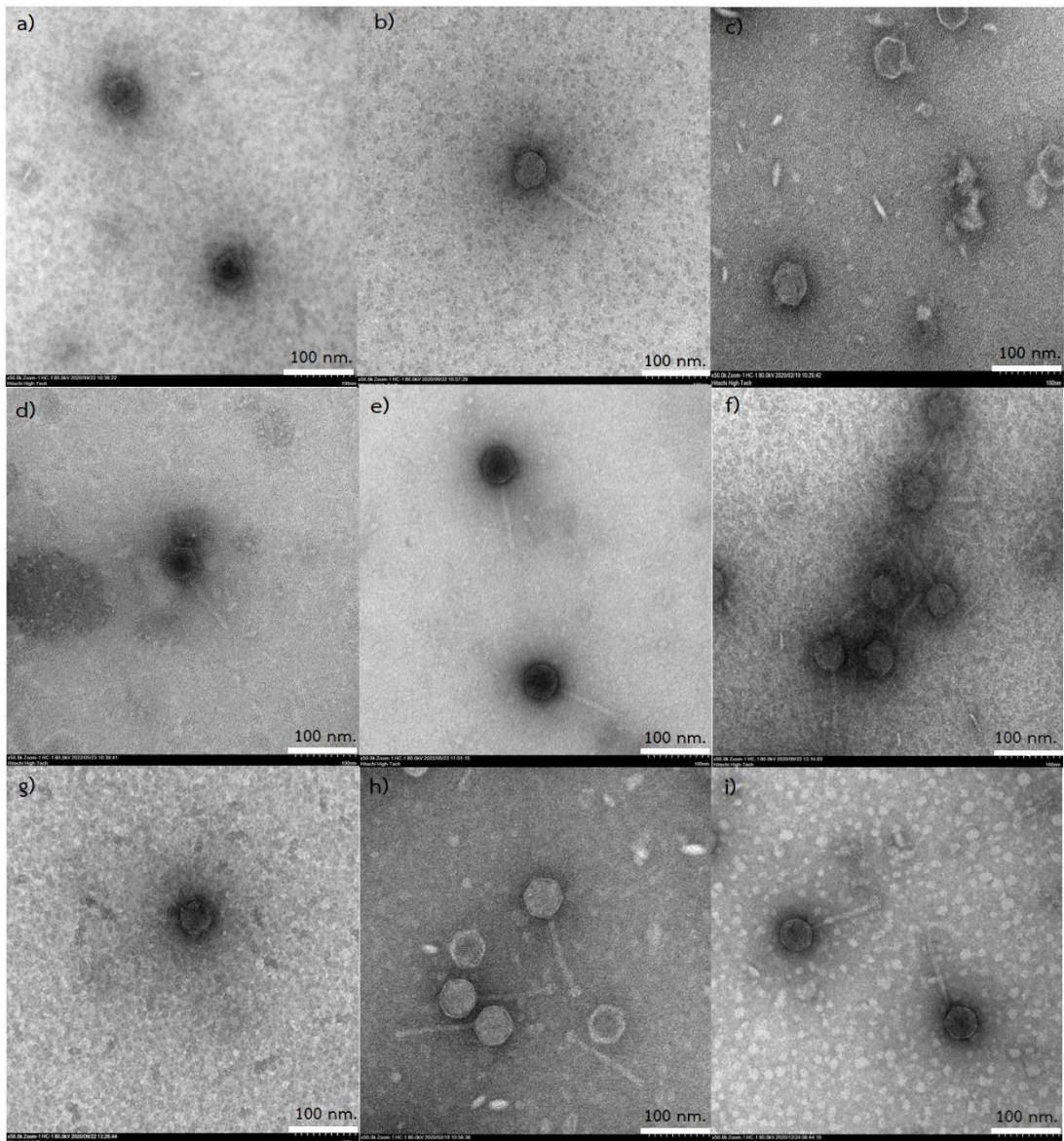
4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโอเฟจ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า ส่วนหัวของเฟจทั้ง 9 ไอโซเลท มีรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตร (icosahedral symmetry) (ภาพที่ 5) เฟจ vB_SCh-RP5i3A, vB_SCh-RP60i3A และ vB_SCh-RP60i4B มีลักษณะหางสั้น ไม่สามารถยืดหดได้ (short non-contractile tail) (ภาพที่ 5a, c และ g) ส่วนเฟจ vB_SCh-RP5i3B, vB_SCh-RP60i3B, vB_SCh-RP60i3C, vB_SCh-RP60i4A, vB_SCh-RP61i3 และ vB_SCh-RP61i4 มีลักษณะหางยาว และไม่สามารถยืดหดได้ (long non-contractile tail) (ภาพที่ 5b, d, e, f, h และ i) ค่าเฉลี่ยขนาดของหัวและหางของเฟจแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงขนาดหัวและหางของแบคทีเรียโอเฟจทั้ง 9 ไอโซเลท

แบคทีเรียโอเฟจ	ขนาดหัว		ขนาดหาง	
	ความกว้าง (นาโนเมตร)	ความยาว (นาโนเมตร)	ความกว้าง (นาโนเมตร)	ความยาว (นาโนเมตร)
vB_SCh-RP5i3A	55.00 ± 4.92	56.40 ± 5.72	9.60 ± 2.27	8.00 ± 2.67
vB_SCh-RP5i3B	48.85 ± 1.86	50.00 ± 0.00	7.69 ± 0.00	99.23 ± 3.03
vB_SCh-RP60i3A	52.50 ± 3.23	52.50 ± 3.23	12.50 ± 0.00	11.25 ± 2.64
vB_SCh-RP60i3B	51.54 ± 3.72	52.31 ± 3.24	7.69 ± 0.00	113.08 ± 5.19
vB_SCh-RP60i3C	47.69 ± 3.24	50.00 ± 4.05	7.69 ± 0.00	93.08 ± 5.68
vB_SCh-RP60i4A	48.46 ± 1.99	50.38 ± 1.22	7.69 ± 0.00	91.15 ± 2.60
vB_SCh-RP60i4B	51.54 ± 1.99	49.23 ± 1.62	6.54 ± 1.86	3.85 ± 0.00
vB_SCh-RP61i3	66.54 ± 1.86	65.38 ± 0.00	11.54 ± 0.00	126.15 ± 3.03
vB_SCh-RP61i4	53.46 ± 1.22	54.23 ± 1.22	7.69 ± 0.00	124.23 ± 3.65

หมายเหตุ: ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวัดผลซ้ำ 10 อนุภาค



ภาพที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) a) vB_SCh-RP5i3A b) vB_SCh-RP5i3B c) vB_SCh-RP60i3A d) vB_SCh-RP60i3B e) vB_SCh-RP60i3C f) vB_SCh-RP60i4A g) vB_SCh-RP60i4B h) vB_SCh-RP61i3 และ i) vB_SCh-RP61i4

4.8 ผลศึกษาจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length

Polymorphism (RFLP)

เมื่อตัดจีโนมของเฟจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่า ดีเอ็นเอของเฟจทั้ง 9 ไอโซเลท ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด และแสดงรูปแบบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 6 ซึ่งสามารถจัดกลุ่มเฟจเบื้องต้นตามรูปแบบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เหมือนกันจากการผลการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ vB_SCh-RP60i3A และ vB_SCh-RP5i3A

กลุ่มที่ 2 คือ vB_SCh-RP60i3B, vB_SCh-RP60i4A, vB_SCh-RP61i3 และ vB_SCh-RP61i4

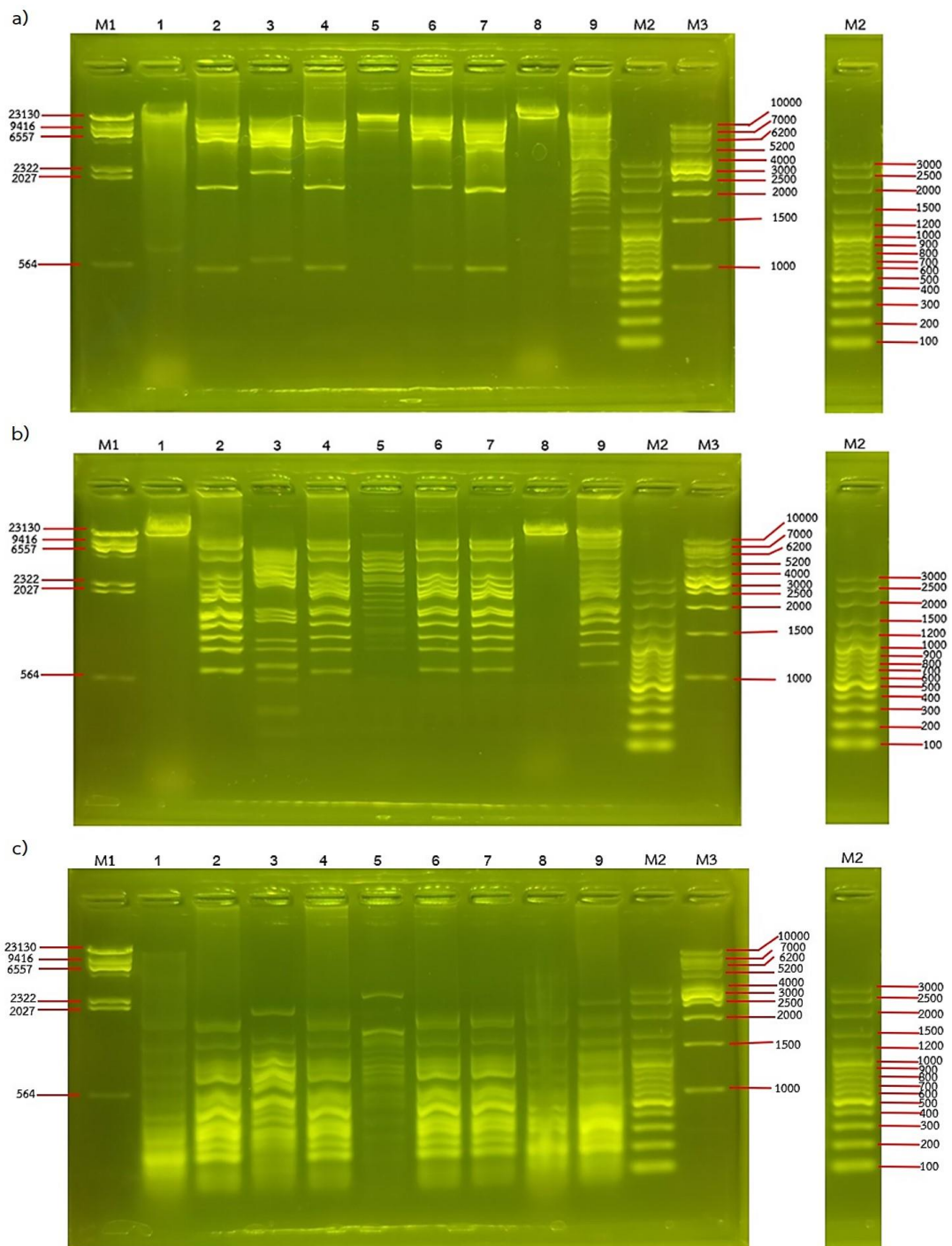
กลุ่มที่ 3 คือ vB_SCh-RP60i3C

กลุ่มที่ 4 คือ vB_SCh-RP60i4B

กลุ่มที่ 5 คือ vB_SCh-RP5i3B

นอกจากนี้สามารถสรุปได้ว่า เฟจที่คัดแยกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (dsDNA) เนื่องจากจีโนมถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ





ภาพที่ 6 ผลการตัดจีโนมของแบคทีเรียโอเฟจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *EcoRI* (a), *EcoRV* (b) และ *HinfI* (c) โดยแถว M1 คือ lambda DNA/*HindIII* marker แถว M2 คือ VC 100bp Plus แถว M3 คือ VC 1kb Marker แถว 1 vB_SCh-RP60i3A แถว 2 คือ vB_SCh-RP60i3B แถว 3 คือ vB_SCh-RP60i3C แถว 4 คือ vB_SCh-RP60i4A แถว 5 คือ vB_SCh-RP60i4B แถว 6 คือ vB_SCh-RP61i3 แถว 7 คือ vB_SCh-RP61i4 แถว 8 คือ vB_SCh-RP5i3A และแถว 9 คือ vB_SCh-RP5i3B

4.9 ประสิทธิภาพของเฟจต่อการฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสถานะของเหลวลำไส้จำลอง (simulated intestinal fluid, SIF)

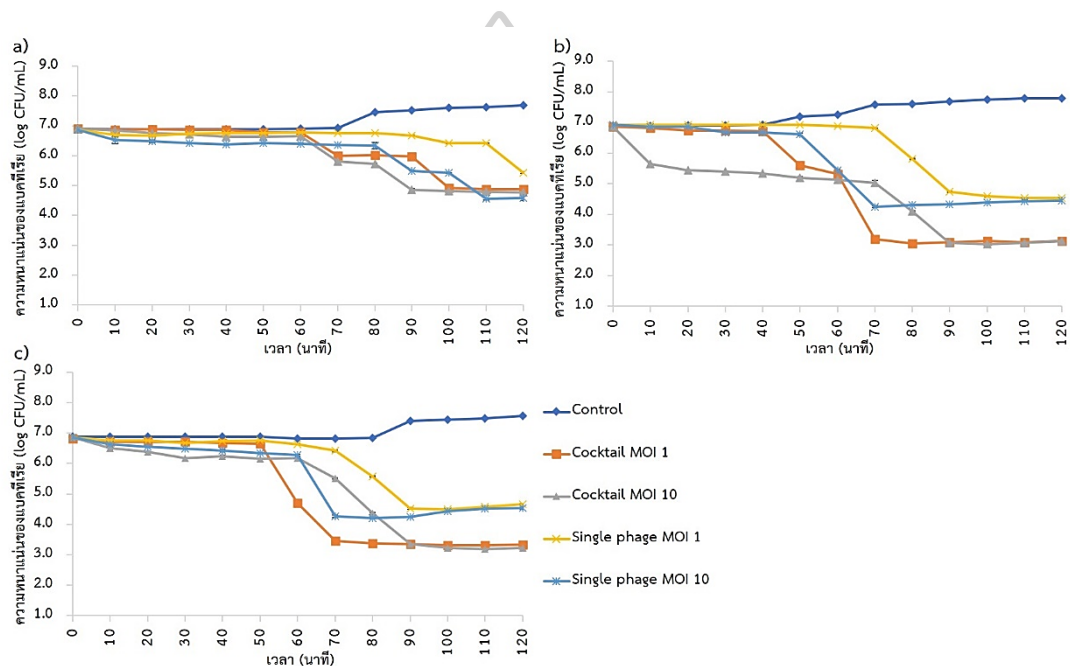
การทดสอบนี้ใช้เพื่อประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของเฟจก่อนการนำไปประยุกต์ใช้ในสัตว์ โดยจะใช้เฟจแต่ละชนิด และเฟจผสมในการทดสอบ ซึ่งเฟจผสมประกอบด้วย เฟจ 3 ไอโซเลท ได้แก่ vB_SCh-RP5i3B, vB_SCh-RP60i4A และ vB_SCh-RP61i4 โดยเฟจเหล่านี้ถูกคัดเลือกได้จากผลศึกษาประสิทธิภาพของเฟจในการทำลาย *Salmonella* สายพันธุ์อื่น และความเสถียรของเฟจที่อุณหภูมิต่าง ๆ และที่ pH ต่ำ พบว่าเฟจทั้ง 3 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเชื้อทดสอบ และเฟจมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4–65 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังสามารถทนต่อ pH ต่ำ (pH 2.5–4.0)

ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ด้วยเฟจใน SIF แสดงให้เห็นว่า เฟจเดี่ยวแต่ละชนิด และเฟจผสม สามารถฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เวลาแตกต่างกัน (ภาพที่ 7) ปริมาณเชื้อ *S. Choleraesuis* KPS585 เมื่อบำบัดด้วยเฟจ vB_SCh-RP5i3B ที่ MOI 1 เริ่มลดลงหลังบ่ม 90 นาที ในขณะที่ MOI 10 เริ่มลดลงหลังบ่ม 80 นาที (ภาพที่ 5a) อย่างไรก็ตาม เมื่อบำบัดด้วยเฟจผสมปริมาณเชื้อเริ่มลดลงหลังบ่ม 60 นาที ทั้งสอง MOI นอกจากนี้ ปริมาณเชื้อ *S. Choleraesuis* KPS585 เมื่อบำบัดด้วยเฟจผสมที่ MOI 1 แสดงการลดลงสูงสุดในนาที่ที่ 100 (2.70 ± 0.02 log CFU/มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($F_{4,10} = 7023.775, p < 0.001$) ในขณะที่ การบำบัดด้วยเฟจผสมที่ MOI 10 แสดงการลดลงสูงสุดในนาที่ที่ 90 (2.65 ± 0.02 log CFU/มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($F_{4,10} = 4470.234, p < 0.001$) (ภาพที่ 7a)

สำหรับการควบคุมเชื้อ *S. Choleraesuis* KPS604-1 ด้วยเฟจ vB_SCh-RP60i4A ที่ MOI 1 พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มลดลงหลังนาที่ที่ 70 ในขณะที่ MOI 10 เชื้อเริ่มลดลงในนาที่ที่ 50 และหลังการบำบัดด้วยเฟจที่ MOI 1 พบการลดลงสูงสุดในนาที่ที่ 110 (3.26 ± 0.03 log CFU/มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($F_{4,10} = 9089.418, p < 0.001$) ในขณะที่ MOI 10 แสดงการลดลงสูงสุดในนาที่ที่ 70 (3.32 ± 0.04 log CFU/มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($F_{4,10} = 3605.821, p < 0.001$) นอกจากนี้สิ่งที่น่าสนใจคือ เมื่อบำบัดด้วยเฟจผสมที่ MOI 10 ปริมาณเชื้อ *S. Choleraesuis* KPS604-1 เริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่นาที่ที่ 10 ในขณะที่ MOI 1 เริ่มลดลงหลังนาที่ที่ 40 (ภาพที่ 7b)

สำหรับการฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* KPS615 เมื่อบำบัดด้วยเฟจ vB_SCh-RP61i4 ที่ MOI 1 พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มลดลงหลังนาที่ที่ 70 ในขณะที่ MOI 10 เริ่มลดลงหลังนาที่ที่ 60 นอกจากนี้ที่ MOI 1 แสดงการลดลงสูงสุดในนาที่ที่ 90 (2.87 ± 0.03 log CFU/มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับ

กลุ่มควบคุม ($F_{4,10} = 6259.109, p < 0.001$) ส่วนที่ MOI 10 แสดงการลดลงสูงสุดในนาที่ที่ 70 ($2.57 \pm 0.02 \log \text{CFU/มิลลิลิตร}$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($F_{4,10} = 9605.463, p < 0.001$) อย่างไรก็ตาม หลังการบำบัดด้วยเฟจผสมที่ MOI 1 ปริมาณเชื้อเริ่มลดลงในนาที่ที่ 50 และแสดงการลดลงสูงสุดในนาที่ที่ 70 ($3.37 \pm 0.02 \log \text{CFU/มิลลิลิตร}$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($F_{4,10} = 9605.463, p < 0.001$) ในขณะเดียวกัน ที่ MOI 10 ปริมาณเชื้อเริ่มลดลงหลังนาที่ที่ 60 และแสดงการลดลงสูงสุดในนาที่ที่ 90 ($4.04 \pm 0.03 \log \text{CFU/มิลลิลิตร}$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($F_{4,10} = 6259.109, p < 0.001$) (ภาพที่ 7c)



ภาพที่ 7 การลดลงของ *S. Choleraesuis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อบำบัดด้วยเฟจเดี่ยว และเฟจผสม ใน SIF ที่ MOI 1 และ 10 a) การลดลงของ *S. Choleraesuis* KPS585 โดยใช้เฟจ vB_Sch-RP5i3B และเฟจผสม b) การลดลงของ *S. Choleraesuis* KPS604-1 โดยใช้เฟจ vB_Sch-RP60i4A และเฟจผสม c) การลดลงของ *S. Choleraesuis* KPS615 โดยใช้เฟจ vB_Sch-RP61i4 และเฟจผสม ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ของการทดลอง 3 ซ้ำ ของแต่ละจุดเวลา

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การติดเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสุกร ยังคงเป็นปัญหาสำหรับการผลิตสุกรในปัจจุบัน หากสภาพแวดล้อมภายในฟาร์มมีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมในการเจริญของ *S. Choleraesuis* เชื้อสามารถอยู่รอดและขยายพันธุ์ได้นานกว่า 2 ปี [95] การติดเชื้อ *S. Choleraesuis* กลายเป็นปัญหาในการรักษาโรคในสุกร เนื่องจากเชื้อเกิดการดื้อยาต้านจุลชีพ โดยการดื้อยาต้านจุลชีพนี้เกิดจากการใช้ยาต้านจุลชีพในทางที่ผิด หรือใช้มากเกินไป ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อทั้งมนุษย์และสัตว์ อุปติการณการดื้อยาต้านจุลชีพของ *S. Choleraesuis* ที่ก่อโรคในสุกร มีพัฒนาการดื้อยาหลายชนิดทำให้เกิดความท้าทายในการรักษาโรค [96] Lynne และคณะ [97] พบ *S. Choleraesuis* แสดงการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด คิดเป็น 87% และดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 4 ชนิด คิดเป็น 37.5% ในการศึกษา *S. Choleraesuis* ซึ่งแยกได้จากลำไส้สุกรที่ติดเชื้อ แสดงการดื้อยา gentamicin, enrofloxacin, neomycin และ kanamycin นอกจากนี้ Chang และคณะ [98] รายงานผลการแยก *S. Choleraesuis* จากสุกร แสดงการดื้อยา enrofloxacin และ gentamicin และงานวิจัยของ Gil Molino และคณะ [62] พบว่า *S. Choleraesuis* แสดงการดื้อยา 2 ชนิด หรือมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป ในขณะที่เดียวกัน Onyango และคณะ [99] พบว่า *S. Choleraesuis* ซึ่งแยกได้จากมูลสุกร แสดงการดื้อยา sulfamethoxazole การค้นพบเชื้อสายพันธุ์เดียวกันให้ผลความไวต่อยาต้านจุลชีพที่แตกต่างกัน อาจเกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อในแต่ละประเทศ นอกจากนี้ การใช้ยาต้านจุลชีพที่แตกต่างกันในระหว่างการผลิตสัตว์อาจทำให้เกิดผลการดื้อยาที่แตกต่างกัน [97] ซัลโมเนลลาทุกสายพันธุ์ของการศึกษานี้ พบว่าไวต่อยา colistin sulfate ในทำนองเดียวกัน Cameron-Veas และคณะ [100] แยกซัลโมเนลลาได้จากอุจจาระ ไม่พบการดื้อต่อยา colistin sulfate เช่นเดียวกัน Poolperm และคณะ [101] ได้ค้นพบว่าการรักษาสุกรที่ติดเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ในระยะสั้นด้วยยา colistin สามารถก่อให้เกิดเชื้อที่ดื้อยาอย่างรวดเร็วหลังการรักษาด้วย colistin อย่างไรก็ตามปรากฏการณ์ดื้อยานี้หายไปอย่างรวดเร็วหลังจากยุติการรักษา

สำหรับการศึกษาก่อนหน้า ไส้ติ่งเพกที่ยับยั้งซัลโมเนลลาถูกแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่น น้ำเสีย แหล่งสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างอุจจาระ และสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม [102-106] ในการศึกษา *เพก 9* ไอโซเลทที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ถูกแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ และท่อระบายน้ำจากโรงฆ่าสัตว์ Yajima และ Koottatep [107] สังเกตว่า ตะกอนอุจจาระ และของเสียจากตลาดน่าจะเป็น

แหล่งสำคัญของการปนเปื้อนอีโคไล และซัลโมเนลลาในคลองของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนเชื้อได้จากแหล่งน้ำเสียในโรงฆ่าสัตว์ [108] ด้วยเหตุนี้ เฟจที่จำเพาะต่อซัลโมเนลลาจึงสามารถพบในสภาพแวดล้อมเหล่านี้ ในการศึกษาเฟจที่คัดแยกได้สร้างพลาไคไซ มีขนาดของพลาไคไซแตกต่างกัน และมีรัศมีชั้นล้อมรอบพลาไคไซ (halo) การเกิด halo ล้อมรอบพลาไคไซอาจบ่งชี้ได้ว่าเฟจเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เอส (depolymerase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide) ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย [109]

ในการศึกษานี้การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีริโอเฟจสำหรับทำลายซัลโมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ (EOP) ถูกใช้เพื่อประเมินช่วงโฮสต์ของเฟจแทนวิธี spot test เนื่องจากมีข้อแนะนำว่าการทดสอบด้วยวิธี spot test ไม่ใช่วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเลือกเฟจที่มีช่วงโฮสต์กว้าง เนื่องจากการแตกของเซลล์แบคทีเรีย (lysis) อาจเกิดจากเซลล์ของแบคทีเรียที่ติดเชื้อเกิดการตายก่อนที่เฟจจะเพิ่มจำนวนและปลดปล่อยอนุภาคออกจากเซลล์ จึงทำให้เฟจไม่สามารถติดเชื้อ และแพร่กระจายไปยังเซลล์ใกล้เคียงได้ (abortive infection) หรือเกิดจากการยึดเกาะของเฟจกับโฮสต์ที่สูงกว่าค่าเกณฑ์ ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์แบคทีเรียแตกโดยเกิดจากการขยาย และการถูกทำลายของผนังเซลล์ ซึ่งการแตกของเซลล์แบคทีเรียนี้ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อของเฟจแบบนี้ เรียกว่า lysis from without จึงทำให้ไม่มีการผลิตเฟจรุ่นใหม่ออกมา ดังนั้นจึงอาจนำไปสู่การตีความของการทดสอบที่ผิดพลาด ในขณะที่การทดสอบ EOP จำเป็นต่อการกำหนดประสิทธิภาพของเฟจที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก [110] ในการศึกษา ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการติดเชื้อของเฟจ พบว่าเฟจทั้งหมดสามารถติดเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่นได้นอกจากโฮสต์ของพวกมัน เฟจบางชนิดสามารถติดเชื้อสายพันธุ์ซัลโมเนลลาที่แตกต่างกัน ในทางกลับกัน ระบบต้านทานของโฮสต์ (host resistance system) หรือการยึดเกาะของเฟจกับโฮสต์ (adsorption) ที่ไม่มีประสิทธิภาพอาจส่งผลให้เฟจบางไอโซเลทมีประสิทธิภาพต่ำในการติดเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่น [111] Filippov และคณะ [112] แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงตัวรับ (receptors) ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น และการยึดเกาะบนพื้นผิวแบคทีเรียของเฟจ ดังนั้น ประสิทธิภาพในการทำลายซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่นที่แตกต่างกันของเฟจจึงน่าจะเกี่ยวข้องกับตัวรับที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่มีความเฉพาะเจาะจง และเฟจที่มีช่วงโฮสต์กว้างและมีประสิทธิภาพสูงในการติดเชื้อเหมาะสำหรับการเตรียมเป็นเฟจผสมเพื่อการนำไปใช้

เฟจควรมีความเสถียรในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายเพื่อใช้เป็นสารต้านจุลชีพ อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อการติดเชื้อของเฟจหากอุณหภูมิไม่เหมาะสมจะทำให้การติดเชื้อของเฟจลดลง ในการศึกษาี้ เฟจทั้งหมดมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 4–45 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นของเฟจที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ Bauer และ Evilevitch [113] ได้เสนอว่า เฟจไม่สามารถทำงานที่อุณหภูมิสูงกว่า 65–75 องศาเซลเซียส เนื่องจากเฟจเกิดความล้มเหลวในการรักษาจีโนมที่บรรจุไว้ และคล้ายกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่า เฟจที่จำเพาะต่อซัลโมเนลลาที่มีความเสถียรสูงเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส และความเสถียรลดลงที่อุณหภูมิสูง [114, 115] นอกจากนี้ pH ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความเสถียรของเฟจ โดยทั่วไปเฟจเสถียรที่ pH 5–9 [116] ในกระเพาะอาหารของสุกร มี pH อยู่ระหว่าง 1.15–4.0 [117] ในขณะที่กระเพาะอาหารของลูกสุกรคุดนม หรือสุกรหย่านม มี pH ไม่ต่ำกว่า 2.5 [118] โดยปกติเฟจจะมีความไวต่อสภาวะที่เป็นกรด และสิ่งนี้อาจเป็นสิ่งสำคัญต่อความหนาแน่นของเฟจในกระเพาะอาหารที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [116] การสัมผัสกับสภาวะ pH ต่ำอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อเฟจอย่างถาวร และอาจลดประสิทธิภาพของเฟจบำบัดในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ [119] Yin และคณะ [120] ได้ทดสอบความเสถียรของเฟจ PNJ1901 พบว่าไม่สามารถตรวจพบเฟจที่ pH 2 และ 2.4 หลังบ่ม 15 และ 30 นาทีตามลำดับ ในสภาวะของเหลวกระเพาะอาหารจำลอง (SGF) นอกจากนี้ Ramirez และคณะ [121] แสดงให้เห็นว่า เฟจลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ที่ pH 2.4 หลังบ่ม 30 นาที ในการศึกษาี้ เฟจส่วนใหญ่ยังคงทำงานได้ที่ pH ต่ำ (pH 2.5–4.0) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในสภาวะของเหลวกระเพาะอาหารจำลอง ซึ่งเฟจเหล่านี้ อาจเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจสำหรับนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลาในสัตว์โดยการให้เฟจผ่านระบบทางเดินอาหาร

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเฟจในการศึกษาี้ พบว่าส่วนหัวของเฟจทุกไอโซเลทมีรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตร และมีหาง Ackermann [122] ได้รายงานว่ามีหางมากกว่า 96% ของเฟจ มีหางและมีดีเอ็นเอสองสายที่มีเบสคู่สมจับกันพันเป็นเกลียวคู่ (dsDNA) และมีแคปซิดขนาดตั้งแต่ 30–60 นาโนเมตร มีความยาวหางตั้งแต่ 10–800 นาโนเมตร และการศึกษาี้ พบเฟจ 3 ไอโซเลท มีลักษณะหางสั้น ไม่สามารถยึดหดได้ ในขณะที่อีก 6 ไอโซเลท มีลักษณะหางยาว และไม่สามารถยึดหดได้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจที่แตกต่างกันนี้ อาจชี้ให้เห็นว่าเฟจมีกลไกการจดจำโฮสต์ที่แตกต่างกันเมื่อติดเชื้อแบคทีเรีย [123] การศึกษาจีโนมของเฟจด้วยเทคนิค RFLP สามารถใช้ในการจัดกลุ่มเบื้องต้นของเฟจที่มีดีเอ็นเอสายคู่ เฟจที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมือนกันอย่างน้อย 3 ชนิด อาจถูกจำแนกเป็นเฟจชนิดเดียวกัน หรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้อง

พิจารณาลักษณะอื่น ๆ ด้วย จากผลวิจัยนี้พบว่า เพลงที่มีผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมือนกัน อาจถูกจำแนกเป็นเพลงชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ผลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการศึกษาประสิทธิภาพของเพลงในการทำลายเชื้อสายพันธุ์อื่นให้ผลที่แตกต่างกัน ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าอาจเป็นเพลงคนละชนิดกัน อย่างไรก็ตาม การระบุชนิดของเพลงจำเป็นต้องวิเคราะห์จีโนมของเพลง

การศึกษาการลดลงของแบคทีเรียด้วยเพลงในสภาวะของเหลวลำไส้จำลอง (SIF) ถูกทดสอบเพื่อประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของเพลงก่อนการใช้ในสัตว์ ในการศึกษาครั้งนี้ เพลงเดี่ยวและเพลงผสมสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสภาวะของเหลวลำไส้จำลองได้ อย่างไรก็ตาม เพลงผสมมีประสิทธิภาพในการลด *S. Choleraesuis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีกว่าเพลงเดี่ยว และมีงานวิจัยหลายชิ้นให้ผลที่สอดคล้องกันกับการศึกษาครั้งนี้ [124-127] เพลงผสมอาจช่วยแก้ไขปัญหาเพลงที่มีช่วงโฮสต์แคบได้ นอกจากนี้ ยังสามารถชะลอการพัฒนาของการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ต้านต่อเพลง เนื่องจากการทำเพลงผสม อาจเตรียมได้ทั้งเพลงต่างชนิดกันแต่สามารถฆ่าเชื้อเดียวกันได้ และเตรียมจากเพลงต่างชนิดกันและฆ่าเชื้อต่างชนิดกัน [128, 129] และเพลงผสมที่มีเพลงมากกว่า 2 ชนิด สามารถจับกับตัวรับบนพื้นผิวแบคทีเรียที่ต่างกันอาจช่วยในการชะลอการต้านเพลงของแบคทีเรีย [130] นอกจากนี้ Bai และคณะ [131] รายงานว่า การผสมเพลง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าการผสมเพลงเพียง 2 ชนิด หรือชนิดเดียว จากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ทั้งเพลงเดี่ยวและเพลงผสมไม่กระตุ้นให้เกิดแบคทีเรียที่ต้านต่อเพลงภายใต้สภาวะทดลอง ตามที่รายงานของเราได้รายงานไปก่อนหน้านี้ไม่มีความแตกต่างในด้านประสิทธิภาพระหว่างเพลงผสม และเพลงเดี่ยว อย่างไรก็ตาม การใช้เพลงผสมให้อัตราการพัฒนาค่าความต้านทานต่อเพลงของแบคทีเรียต่ำกว่าการใช้เพลงเดี่ยว [132] ดังนั้น เพลงผสมจึงน่าสนใจสำหรับเป็นตัวเลือกในการใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพสำหรับฆ่าเชื้อซัลโมเนลลาในสัตว์

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ เพลงที่จำเพาะต่อ *S. Choleraesuis* ถูกแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ และตัวอย่างของเหลวจากท่อระบายน้ำในโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งสามารถคัดแยกเพลงได้ทั้งหมด 9 โอลิโกลเพลงแต่ละโอลิโกลเพลงสร้างพลาไคไส และมีขอบขุ่นล้อมรอบ มีขนาดที่แตกต่างกัน โดยมีขนาดน้อยกว่า 1 ถึง 4 มิลลิเมตร ประสิทธิภาพของเพลงสำหรับทำลายซัลโมเนลลาสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า เพลงมีประสิทธิภาพสูงสำหรับฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และ *S. Rissen* นอกจากนี้ เพลงเหล่านี้ยังสามารถอยู่รอดได้ในอุณหภูมิที่หลากหลาย (อุณหภูมิ 4–65 องศาเซลเซียส) และที่ pH ต่ำ (pH 2.5–4.0) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเพลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

แบบส่องผ่าน พบส่วนหัวของเฟจทั้ง 9 ไอโซเลท มีรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตร (icosahedral symmetry) ส่วนหางมีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ เฟจ 3 ไอโซเลท มีลักษณะหางสั้น ส่วนอีก 6 ไอโซเลท มีลักษณะหางยาว และไม่สามารถยึดหดได้ และผลการตัดจีโนมของเฟจด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถจัดกลุ่มเฟจออกเป็น 5 กลุ่ม เฟจที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันมีลักษณะทาง สัณฐานวิทยา และประสิทธิภาพของเฟจสำหรับทำลายเชื้อสายพันธุ์อื่นที่เหมือนกัน ประสิทธิภาพของ เฟจต่อการฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสภาวะของเหลวลำไส้จำลอง (SIF) แสดงให้เห็นว่า เฟจผสมที่ ประกอบไปด้วยเฟจ 3 ไอโซเลท ได้แก่ vB_SCh-RP5i3B, vB_SCh-RP60i4A และ vB_SCh-RP61i4 สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. Choleraesuis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าเฟจเดี่ยว การค้นพบนี้ ชี้ให้เห็นว่า เฟจผสมอาจเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจสำหรับใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพในการฆ่าเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสุกรโดยการให้เฟจผ่านทางปากโดยตรง อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ในสัตว์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเฟจเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่น่าสนใจในการรับมือวิกฤต เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อ *S. Choleraesuis* ที่ก่อโรคในสุกร เนื่องจากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า เฟจที่แยกได้มี ประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ *S. Choleraesuis* ในสภาวะของเหลวลำไส้จำลอง (SIF) อย่างไรก็ตาม การทดลองเฟจในสัตว์ (*in vivo*) ก็เป็นสิ่งจำเป็นต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในสัตว์ต่อไป เนื่องจากหากมีการให้เฟจกับสัตว์ผ่านทางปากโดยตรง และผ่านระบบทางเดินอาหารของสัตว์ pH ที่ ต่ำของกรดในกระเพาะอาหารสามารถส่งผลต่อการมีชีวิตของเฟจบางชนิด ทำให้เฟจบางชนิดไม่ สามารถมีชีวิตรอดได้ ดังนั้นการทดลองเฟจในสัตว์จึงจำเป็นในการศึกษาต่อไป ทั้งนี้การนำเฟจไป ประยุกต์ใช้ในสัตว์ การให้เฟจในรูปแบบน้ำ มีข้อดีว่าการผสมเฟจกับอาหาร เนื่องจากในรูปแบบน้ำ เฟจสามารถผ่านไปยังลำไส้ได้ค่อนข้างไว แต่หากผสมกับอาหารอาจทำให้เฟจคงอยู่ในกระเพาะอาหาร ที่ยาวนานกว่าหลายชั่วโมง จึงอาจส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเฟจได้ นอกจากนี้ หากคำนึงถึงระบบ ภูมิคุ้มกันต่อต้านเฟจ ซึ่งโดยปกติระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ หากมีสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกายจะมี แอนติบอดีออกมาจับสิ่งแปลกปลอมเพื่อขัดขวางการทำงาน [133] ดังนั้นการให้เฟจผ่านการกินจึงมี ข้อดีมากกว่าการฉีดเข้าทางกระแสเลือด เนื่องจากเฟจสามารถผ่านในระบบทางเดินอาหารได้เร็วกว่า แบบฉีด ดังนั้นการให้เฟจโดยการกินผ่านระบบทางเดินอาหารจึงไม่ค่อยมีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกัน ยับยั้งมากเท่าการฉีดเข้าทางกระแสเลือด อย่างไรก็ตามหากเฟจมีความไวต่อ pH ของกรดในกระเพาะ

อาหารนี้อาจจำเป็นต้องหาวิธีในการป้องกันเฟจ ซึ่งอาจจะทำให้เฟจผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต โดยสารละลายบัฟเฟอร์จะทำให้กรดในกระเพาะอาหารของสัตว์เป็นกลาง วิธีนี้ควรให้เฟจทุก ๆ 8 ชั่วโมงก่อนการให้อาหารมื้อหลักแก่สัตว์ [134] หรือใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูลชัน (microencapsulation) เป็นเทคนิคการห่อหุ้มเฟจด้วยพอลิเมอร์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์และสามารถป้องกันเฟจจากกรดในกระเพาะอาหารได้ [94] รวมถึงเพื่อประเมินความปลอดภัยของเฟจเมื่อเข้าไปในร่างกายสัตว์ และควรมีการวิเคราะห์จีโนมของเฟจเพื่อตรวจสอบให้แน่ชัดว่าเฟจบำบัดที่ใช้เป็นไลติกหรือไลโซจินิกเฟจ เนื่องจากเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลติกจะสามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แบคทีเรียและทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก ในขณะที่เฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลโซจินิกจะสอดแทรกจีโนมเข้าไปรวมกับจีโนมของแบคทีเรีย และไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก อีกทั้งเฟจสามารถถ่ายโอนสารพันธุกรรม เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ หรือยีนดื้อยาปฏิชีวนะไปยังแบคทีเรียเซลล์ใหม่ได้ ก่อให้เกิดความรุนแรงของเชื้อมากยิ่งขึ้น [135] ดังนั้นไลโซจินิกเฟจจึงไม่เหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็นเฟจบำบัด นอกจากนี้การวิเคราะห์จีโนมของเฟจอาจทำให้พบโปรตีนชนิดใหม่ที่อาจนำไปใช้เป็นเครื่องมือทางเทคโนโลยีชีวภาพและทางการแพทย์ได้ และช่วยให้ทราบถึงกลไกทางชีวภาพที่หลากหลายของเฟจที่ใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียระหว่างการติดเชื้อ อีกทั้งยังช่วยในการค้นพบเฟจชนิดใหม่ที่ไม่เคยรู้จักมาก่อนซึ่งมีประโยชน์ในแง่ความหลากหลายทางชีวภาพของเฟจ [136]



รายการอ้างอิง

1. Lee, H. and Yoon, Y. (2021) Etiological agents implicated in foodborne illness world wide. *Food Sci Anim Resour*, 41(1): 1–7.
2. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2021) The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(12): 6971.
3. Sanchez, S., Hofacre, C.L., Lee, M.D., Maurer, J.J. and Doyle, M.P. (2002) Animal sources of salmonellosis in humans. *J Am Vet Med Assoc*, 221(4): 492–497.
4. VanderWaal, K. and Deen, J. (2018) Global trends in infectious diseases of swine. *PNAS*, 115(45): 11495–11500.
5. Simons, R., Hill, A., Swart, A., Kelly, L. and Snary, E. (2016) A transport and lairage model for *Salmonella* transmission between pigs applicable to EU member states. *Risk Analysis*, 36(3): 482–497.
6. Wray, C. and Wray, A. (2000) *Salmonella* in domestic animals. Cabi.
7. Piras, F., Fois, F., Mazza, R., Putzolu, M., Delogu, M.L., Lochi, P.G., Pani, S.P. and Mazzette, R. (2014) *Salmonella* prevalence and microbiological contamination of pig carcasses and slaughterhouse environment. *Ital J Food Saf*, 3(4): 4581.
8. Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N., Grijspeerdt, K. and Herman, L. (2003) *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *J Appl Microbiol*, 95(5): 891–903.
9. Meyer, C., Thiel, S., Ullrich, U. and Stolle, A. (2010) *Salmonella* in raw meat and by-products from pork and beef. *J Food Prot*, 73(10): 1780–1784.
10. Sargeant, J.M., Totton, S.C., Plishka, M. and Vriezen, E.R. (2021) *Salmonella* in animal feeds: a scoping review. *Front Vet Sci*, 8: 727495.
11. Shim, M., Hong, S., Seok, M.-J. and Kim, H.B. (2016) Salmonellosis in swine: clinical perspectives. *KJOAS*, 43(3): 320–329.
12. Chiu, C.H., Su, L.H. and Chu, C. (2004) *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin Microbiol Rev*, 17(2): 311–322.

13. Dar, M.A., Mumtaz, P.T., Bhat, S.A., Taban, Q., Khan, S.A., Bandy, T. and Ahmad, S.M. (2019) Immunopathogenesis of Salmonellosis, in *New Insight into Brucella Infection and Foodborne Diseases IntechOpen*.
14. Sirichote, P., Hasman, H., Pulsrikarn, C., Schønheyder, H.C., Samulionienė, J., Pornruangmong, S., Bangtrakulnonth, A., Aarestrup, F.M. and Hendriksen, R.S. (2010) Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase-producing *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from patients in Thailand and Denmark. *J Clin Microbiol*, 48(3): 883–888.
15. Amortegui, C., Rubio, L., Amature, M. and Rondon Barragan, I. (2011) Resistencia Antibiótica en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aisladas de granjas porcícolas en el departamento del Tolima. *Orinoquia*, 15(1): 71–78.
16. Demirbilek, S.K. (2018) Salmonellosis in Animals, in *Salmonella - A Re-emerging Pathogen IntechOpen*.
17. Barrow, P.A. and Methner, U. (2013) *Salmonella* in domestic animals. CABI.
18. Barton, M.D. (2014) Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr Opin Microbiol*, 19: 9–15.
19. Casanova, L.M., Hill, V.R. and Sobsey, M.D. (2020) Antibiotic-resistant *Salmonella* in swine wastes and farm surface waters. *Lett Appl Microbiol*, 71(1): 117–123.
20. Giraldo-Cardona, J., Gualdrón, D., Chamorro-Tobar, I., Pulido, A., Santamaria-Durán, N., Castañeda-Salazar, R., Zambrano-Moreno, C. and Carrascal-Camacho, A. (2019) *Salmonella* spp. prevalence, antimicrobial resistance and risk factor determination in Colombian swine farms. *Pesq. Vet. Bras*, 39(10): 816–822.
21. Jiang, Z., Paudyal, N., Xu, Y., Deng, T., Li, F., Pan, H., Peng, X., He, Q. and Yue, M. (2019) Antibiotic Resistance Profiles of *Salmonella* Recovered From Finishing Pigs and Slaughter Facilities in Henan, China. *Front Microbiol*, 10: 1513.
22. Keelara, S., Scott, H.M., Morrow, W.M., Gebreyes, W.A., Correa, M., Nayak, R., Stefanova, R. and Thakur, S. (2013) Longitudinal study of distributions of similar antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars in pigs and their environment in two distinct swine production systems. *Appl Environ Microbiol*, 79(17): 5167–5178.
23. Tadee, P., Patchanee, P., Pascoe, B., Sheppard, S.K., Meunsene, D. and Tadee, P.

- (2020) Antimicrobial resistant *Salmonella* spp. circulating in antibiotic-free organic pig farms of northern-Thailand. *bioRxiv*.
24. da Costa, P.M., Loureiro, L. and Matos, A.J. (2013) Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *Int J Environ Res Public Health*, 10(1): 278–294.
 25. Angulo, F.J., Nargund, V.N. and Chiller, T.C. (2004) Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51(8–9): 374–379.
 26. Kutateladze, M., Leshkasheli, L., Bolkvadze, D., Askilashvili, L. and Balarjishvili, N. (2016) Bacteriophages against multidrug resistant bacterial infections. *IJID*, 53: 46–47.
 27. Gigante, A. and Atterbury, R.J. (2019) Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively-reared livestock. *Virology*, 16(1): 1–9.
 28. Ross, A., Ward, S. and Hyman, P. (2016) More is better: selecting for broad host range bacteriophages. *Front Microbiol*, 7: 1352.
 29. Chan, B.K., Abedon, S.T. and Loc-Carrillo, C. (2013) Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol*, 8(6): 769–783.
 30. Gill, J.J. and Hyman, P. (2010) Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 11(1): 2–14.
 31. Callaway, T.R., Edrington, T.S., Brabban, A., Kutter, B., Karriker, L., Stahl, C., Wagstrom, E., Anderson, R., Poole, T.L., Genovese, K., Krueger, N., Harvey, R. and Nisbet, D.J. (2011) Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce *Salmonella* populations in growing swine. *Foodborne Pathog Dis*, 8(2): 261–266.
 32. Saez, A.C., Zhang, J., Rostagno, M.H. and Ebner, P.D. (2011) Direct feeding of microencapsulated bacteriophages to reduce *Salmonella* colonization in pigs. *Foodborne Pathog Dis*, 8(12): 1269–1274.
 33. Seo, B.J., Song, E.T., Lee, K., Kim, J.W., Jeong, C.G., Moon, S.H., Son, J.S., Kang, S.H., Cho, H.S., Jung, B.Y. and Kim, W.I. (2018) Evaluation of the broad-spectrum

- lytic capability of bacteriophage cocktails against various *Salmonella* serovars and their effects on weaned pigs infected with *Salmonella* Typhimurium. *J Vet Med Sci*, 80(6): 851–860.
34. Wall, S.K., Zhang, J., Rostagno, M.H. and Ebner, P.D. (2010) Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. *Appl Environ Microbiol*, 76(1): 48–53.
 35. Bhunia, A.K. (2018) Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. Springer.
 36. Andino, A. and Hanning, I. (2015) *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal*, 2015: 520179.
 37. Silva, C., Calva, E. and Maloy, S. (2014) One health and food-borne disease: *Salmonella* Transmission between humans, animals, and plants. *Microbiol Spectr*, 2(1): Oh-0020-2013.
 38. Reed, W., Olander, H. and Thacker, H. (1986) Studies on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Choleraesuis var kunzendorf infection in weanling pigs. *American journal of veterinary research*, 47(1): 75–83.
 39. Argüello, H., Estellé, J., Zaldivar-López, S., Jiménez-Marín, Á., Carvajal, A., López-Bascón, M., Crispie, F., O'Sullivan, O., Cotter, P.D. and Priego-Capote, F. (2018) Early *Salmonella* Typhimurium infection in pigs disrupts microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. *Scientific reports*, 8(1): 1–12.
 40. Martelli, F., Oastler, C., Barker, A., Jackson, G., Smith, R.P. and Davies, R. (2021) Abattoir-based study of *Salmonella* prevalence in pigs at slaughter in Great Britain. *Epidemiology and Infection*, 149: e218.
 41. Laber, K.E., Whary, M.T., Bingel, S.A., Goodrich, J.A., Smith, A.C. and Swindle, M.M. (2002) Biology and diseases of swine. *Laboratory Animal Medicine*: 615–673.
 42. Fedorka-Cray, P.J., Kelley, L.C., Stabel, T.J., Gray, J.T. and Laufer, J.A. (1995) Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* typhimurium in swine. *Infection and immunity*, 63(7): 2658–2664.

43. Proux, K., Cariolet, R., Fravallo, P., Houdayer, C., Keranflech, A. and Madec, F. (2001) Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. *Veterinary research*, 32(6): 591–600.
44. Hedemann, M.S., Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J. and Jensen, B.B. (2005) Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. *Journal of animal science*, 83(7): 1554–1562.
45. Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Stabel, T.J. and Kramer, T.T. (1996) Natural transmission of *Salmonella* Choleraesuis in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1): 141–146.
46. Callaway, T.R., Morrow, J.L., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Dowd, S., Carroll, J., Dailey, J.W., Harvey, R.B., Poole, T.L., Anderson, R.C. and Nisbet, D.J. (2006) Social stress increases fecal shedding of *Salmonella* Typhimurium by early weaned piglets. *Curr Issues Intest Microbiol*, 7(2): 65–71.
47. De Busser, E.V., Maes, D., Houf, K., Dewulf, J., Imberechts, H., Bertrand, S. and De Zutter, L. (2011) Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *International journal of food microbiology*, 145(1): 279–286.
48. Österberg, J. (2010) *Salmonella* in pigs. Vol. 2010.
49. Rodríguez, D.M. and Suárez, M.C. (2014) *Salmonella* spp. in the pork supply chain: a risk approach. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 27(2): 65–75.
50. Rondón-Barragán, I.S., Arcos, E.C., Mora-Cardona, L. and Fandiño, C. (2015) Characterization of *Salmonella* species from pork meat in Tolima, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 28(1): 74–82.
51. Patchanee, P., Tansiricharoenkul, K., Buawiratler, T., Wiratsudakul, A., Angchokchatchawal, K., Yamsakul, P., Yano, T., Boonkhot, P., Rojanasatien, S. and Tadee, P. (2016) *Salmonella* in pork retail outlets and dissemination of its pulsotypes through pig production chain in Chiang Mai and surrounding areas, Thailand. *Preventive veterinary medicine*, 130: 99–105.
52. Ngo, H.H.T., Nguyen-Thanh, L., Pham-Duc, P., Dang-Xuan, S., Le-Thi, H., Denis-

- Robichaud, J., Nguyen-Viet, H., Le, T.T., Grace, D. and Unger, F. (2021) Microbial contamination and associated risk factors in retailed pork from key value chains in Northern Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 346: 109163.
53. Barton, M.D. (2014) Impact of antibiotic use in the swine industry. *Current opinion in microbiology*, 19: 9-15.
54. Gomes-Neves, E., Antunes, P., Manageiro, V., Gärtner, F., Caniça, M., da Costa, J.M.C. and Peixe, L. (2014) Clinically relevant multidrug resistant *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir. *Veterinary Microbiology*, 168(1): 229–233.
55. Marshall, B.M. and Lévy, S.B. (2011) Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, 24(4): 718–733.
56. Pornsukarom, S. and Thakur, S. (2016) Assessing the impact of manure application in commercial swine farms on the transmission of antimicrobial resistant *Salmonella* in the environment. *PLOS ONE*, 11(10): e0164621.
57. Lekagul, A., Tangcharoensathien, V. and Yeung, S. (2019) Patterns of antibiotic use in global pig production: a systematic review. *Veterinary and animal science*, 7: 100058.
58. Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., Mills, A., Rushton, J. and Yeung, S. (2020) How antibiotics are used in pig farming: a mixed-methods study of pig farmers, feed mills and veterinarians in Thailand. *BMJ global health*, 5(2): e001918.
59. Burch, D.G., Duran, C.O. and Aarestrup, F.M. (2008) Guidelines for antimicrobial use in swine. *Guide to antimicrobial use in animals*: 102–125.
60. Holman, D.B. and Chénier, M.R. (2015) Antimicrobial use in swine production and its effect on the swine gut microbiota and antimicrobial resistance. *Canadian journal of microbiology*, 61(11): 785–798.
61. Sisak, F., Havlickova, H., Hradecka, H., Rychlik, I., Kolackova, I. and Karpiskova, R. (2006) Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolates from pigs in the Czech Republic. *Veterinari Medicina*, 51(5): 303–310.
62. Gil Molino, M., García, A., Zurita, S.G., Martín-Cano, F.E., García-Jiménez, W., Risco, D., Rey, J., Fernández-Llario, P. and Quesada, A. (2020) Spread of antimicrobial resistance by *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis between close

- domestic and wild environments. *J. Antibiot*, 9(11): 750.
63. Jiang, Z., Anwar, T.M., Peng, X., Biswas, S., Elbediwi, M., Li, Y., Fang, W. and Yue, M. (2021) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from pig-borne food products in Henan, China. *Food Control*, 121: 107535.
 64. Clokie, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V. and Heaphy, S. (2011) Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1): 31–45.
 65. Duckworth, D.H. (1976) Who discovered bacteriophage? *Bacteriological reviews*, 40(4): 793–802.
 66. Thanki, A.M., Hooton, S., Gigante, A.M., Atterbury, R.J. and Clokie, M.R. (2021) Potential roles for bacteriophages in reducing *Salmonella* from poultry and swine.
 67. Orlova, E. (2012) Bacteriophages and their structural organisation. InTech.
 68. Weinbauer, M.G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews*, 28(2): 127-181.
 69. Hanlon, G.W. (2007) Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International journal of antimicrobial agents*, 30(2): 118–128.
 70. Stone, E., Campbell, K., Grant, I. and McAuliffe, O. (2019) Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses*, 11(6): 567.
 71. Fortier, L.C. and Sekulovic, O. (2013) Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5): 354-65.
 72. Al-Anany, A.M., Fatima, R. and Hynes, A.P. (2021) Temperate phage-antibiotic synergy eradicates bacteria through depletion of lysogens. *Cell Reports*, 35(8): 109172.
 73. Batinovic, S., Wassef, Knowler, S., Rice, Stanton, Rose, Tucci, Nittami, T., Vinh, Drummond, Sobey, Chan, Seviour, R., Petrovski, S. and Franks, A. (2019) Bacteriophages in natural and artificial environments. *Pathogens*, 8: 100.
 74. Cohen, J.A. (1967) Chemistry and structure of nucleic acids of bacteriophages. *Science*, 158(3799): 343–351.
 75. Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R.K. and Vairale, M.G. (2017) Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia*

- microbiologica*, 62(1): 17–55.
76. Leiman, P., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V., Arisaka, F. and Rossmann, M. (2003) Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(11): 2356–2370.
 77. Gill, J.J. and Hyman, P. (2010) Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1): 2–14.
 78. Jamal, M., Bukhari, S.M., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M.A., Hussain, T., Rahman, S.U. and Shah, S.S. (2019) Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of basic microbiology*, 59(2): 123–133.
 79. Duckworth, D.H. and Gulig, P.A. (2002) Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs*, 16(1): 57–62.
 80. Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A.-S. and Lavigne, R. (2012) Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein and Peptide Science*, 13(8): 699–722.
 81. Loc-Carrillo, C. and Abedon, S.T. (2011) Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2): 111–114.
 82. Bragg, R., van der Westhuizen, W., Lee, J.Y., Coetsee, E. and Boucher, C. (2014) Bacteriophages as potential treatment option for antibiotic resistant bacteria. *Advances in experimental medicine and biology*, 807: 97–110.
 83. Hendrix, R.W., Smith, M.C., Burns, R.N., Ford, M.E. and Hatfull, G.F. (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5): 2192–7.
 84. Khalifa, L., Brosh, Y., Gelman, D., Copenhagen-Glazer, S., Beyth, S., Poradosu-Cohen, R., Que, Y.A., Beyth, N. and Hazan, R. (2015) Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8): 2696–2705.
 85. Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S. and Abedon, S.T. (2010) Phage therapy in clinical practice: treatment of human

- infections. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1): 69–86.
86. Pirnay, J.-P., Blasdel, B.G., Bretaudeau, L., Buckling, A., Chanishvili, N., Clark, J.R., Corte-Real, S., Debarbieux, L., Dublanchet, A. and De Vos, D. (2015) Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharmaceutical research*, 32(7): 2173–2179.
 87. Zhang, J., Li, Z., Cao, Z., Wang, L., Li, X., Li, S. and Xu, Y. (2015) Bacteriophages as antimicrobial agents against major pathogens in swine: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1): 1-7.
 88. Gebru, E., Lee, J., Son, J., Yang, S., Shin, S., Kim, B., Kim, M. and Park, S. (2010) Effect of probiotic-, bacteriophage-, or organic acid-supplemented feeds or fermented soybean meal on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of grower pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Journal of animal science*, 88(12): 3880–3886.
 89. Hooton, S.P., Atterbury, R.J. and Connerton, I.F. (2011) Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *International journal of food microbiology*, 151(2): 157–163.
 90. Sirdesai, S., Eraclio, G., Peterson, R., van Mierlo, J. and De Vegt, B. (2018) Efficiency of phage intervention on *Salmonella* kill on lean pork, pork trim and bacon. *Meat and Muscle Biology*, 2(2).
 91. Zeng, Y., Wang, Z., Zou, T., Chen, J., Li, G., Zheng, L., Li, S. and You, J. (2021) Bacteriophage as an alternative to antibiotics promotes growth performance by regulating intestinal inflammation, intestinal barrier function and gut microbiota in weaned piglets. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.
 92. Clinical and Laboratory Standards Institute (2016) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed., n.p.
 93. Berardi, A., Evans, D.J., Bombelli, F.B. and Lomonosoff, G.P. (2018) Stability of plant virus-based nanocarriers in gastrointestinal fluids. *Nanoscale*, 10(4): 1667–1679.
 94. Ma, Y., Pacan, J.C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A. and Sabour, P.M. (2008) Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl Environ Microbiol*, 74(15): 4799–4805.

95. Arrus, K.M., Holley, R.A., Ominski, K.H., Tenuta, M. and Blank, G. (2006) Influence of temperature on *Salmonella* survival in hog manure slurry and seasonal temperature profiles in farm manure storage reservoirs. *Livestock Science*, 102(3): 226-236.
96. Sakano, C., Morita, Y., Goto, K., Yokota, Y., Annaka, H., Fujita, M., Kobatake, S., Ishioka, T., Hoshino, T., Boonmar, S., Pulsrikarn, C., Nishina, A., Kozawa, K., Yamamoto, S. and Kimura, H. (2011) Prevalence and genotype of *Salmonella* Choleraesuis in Gunma Prefecture, Japan. *TJVM*, 41: 321–326.
97. Lynne, A.M., Dorsey, L.L., David, D.E. and Foley, S.L. (2009) Characterisation of antibiotic resistance in host-adapted *Salmonella enterica*. *Int J Antimicrob Agents*, 34(2): 169–172.
98. Chang, C.C., Lin, Y.H., Chang, C.F., Yeh, K.S., Chiu, C.H., Chu, C., Chien, M.S., Hsu, Y.M., Tsai, L.S. and Chiou, C.S. (2005) Epidemiologic relationship between fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis strains isolated from humans and pigs in Taiwan (1997 to 2002). *J Clin Microbiol*, 43(6): 2798–2804.
99. Onyango, D.M., Ndeda, V.M., Wandili, S.A., Wawire, S.A. and Ochieng, P. (2014) Antimicrobial profile of *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis from free-range swine in Kakamega fish market, western Kenya. *J Infect Dev Ctries*, 8(11): 1381–1390.
100. Cameron-Veas, K., Fraile, L., Napp, S., Garrido, V., Grilló, M.J. and Migura-Garcia, L. (2018) Multidrug resistant *Salmonella enterica* isolated from conventional pig farms using antimicrobial agents in preventative medicine programmes. *Vet J*, 234: 36–42.
101. Poolperm, P., Tangkoskul, T., Seenama, C., Maknakhon, N. and Thamlikitkul, V. (2020) Association between the use of colistin for short-term treatment of Gram-negative bacterial infections and the emergence of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* in swine from selected swine farms in Thailand. *PLoS One*, 15(10): e0238939.
102. Fiorentin, L., Vieira, N.D., Barioni-Júnior, W. and Barros, S. (2004) In vitro characterization and in vivo properties of *Salmonellae* lytic bacteriophages

- isolated from free-range layers. *Braz. J. Poult. Sci*, 6(2): 121–128.
103. Huang, C., Virk, S.M., Shi, J., Zhou, Y., Willias, S.P., Morsy, M.K., Abdelnabby, H.E., Liu, J., Wang, X. and Li, J. (2018) Isolation, characterization, and application of bacteriophage LPSE1 against *Salmonella enterica* in ready to eat (RTE) foods. *Front. Microbiol*, 9: 1046.
 104. Kumar, A., Malik, H., Dubal, Z.B., Jaiswal, R.K., Kumar, S., Kumar, B. and Agarwal, R.K. (2022) Isolation and characterization of *Salmonella* phages and phage cocktail mediated biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chicken meat. *LWT*, 155: 112957.
 105. Var, I., Heshmati, B. and AlMatar, M. (2018) Isolation and identification of *Salmonella* Bacteriophage from sewage waters. *Journal of Biotechnol Sci Res*, 5(2): 1–8.
 106. Yi, Y. (2019). Characterization of *Salmonella* bacteriophages isolated from farm environments for use in decontamination of liquid whole egg. The Ohio State University, Retrieved from http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=osu1566222931949046
 107. Yajima, A. and Koottatep, T. (2010) Assessment of *E. coli* and *Salmonella* spp. infection risks associated with different fecal sludge disposal practices in Thailand. *J Water Health*, 8(2): 355–364.
 108. Piras, F., Fois, F., Mazza, R., Putzolu, M., Delogu, M.L., Lochi, P.G., Pani, S.P. and Mazzette, R. (2014) *Salmonella* prevalence and microbiological contamination of pig carcasses and slaughterhouse environment. *Italian journal of food safety*, 3(4).
 109. Vukotic, G., Obradovic, M., Novovic, K., Di Luca, M., Jovcic, B., Fira, D., Neve, H., Kojic, M. and McAuliffe, O. (2020) Characterization, antibiofilm, and depolymerizing activity of two phages active on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front. Med*, 7(426).
 110. Imklin, N. and Nasanit, R. (2020) Characterization of *Salmonella* bacteriophages and their potential use in dishwashing materials. *J Appl Microbiol*, 129(2): 266–277.
 111. Letarov, A.V. and Kulikov, E.E. (2018) Determination of the Bacteriophage Host

- Range: Culture-Based Approach. *Methods Mol Biol*, 1693: 75–84.
112. Filippov, A.A., Sergueev, K.V., He, Y., Huang, X.-Z., Gnade, B.T., Mueller, A.J., Fernandez-Prada, C.M. and Nikolich, M.P. (2011) Bacteriophage-Resistant Mutants in *Yersinia pestis*: Identification of Phage Receptors and Attenuation for Mice. *PLoS One*, 6(9): e25486.
 113. Bauer, D.W. and Evilevitch, A. (2015) Influence of internal DNA pressure on stability and infectivity of phage λ . *J Mol Biol*, 427(20): 3189–3200.
 114. Jung, L.S., Ding, T. and Ahn, J. (2017) Evaluation of lytic bacteriophages for control of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 16(1): 66.
 115. Shang, Y., Sun, Q., Chen, H., Wu, Q., Chen, M., Yang, S., Du, M., Zha, F., Ye, Q. and Zhang, J. (2021) Isolation and characterization of a novel *Salmonella* phage vB_SalP_TR2. *Front Microbiol*, 12: 664810.
 116. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R. and Górski, A. (2011) The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol (Praha)*, 56(3): 191–200.
 117. Henze, L.J., Koehl, N.J., Bennett-Lenane, H., Holm, R., Grimm, M., Schneider, F., Weitschies, W., Koziol, M. and Griffin, B.T. (2021) Characterization of gastrointestinal transit and luminal conditions in pigs using a telemetric motility capsule. *Eur J Pharm Sci* 156: 105627.
 118. Snoeck, V., Cox, E., Verdonck, F., Joensuu, J.J. and Goddeeris, B.M. (2004) Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 fimbriae for oral immunisation. *Vet Microbiol*, 98(1): 45–53.
 119. Nobrega, F.L., Costa, A.R., Santos, J.F., Siliakus, M.F., van Lent, J.W.M., Kengen, S.W.M., Azeredo, J. and Kluskens, L.D. (2016) Genetically manipulated phages with improved pH resistance for oral administration in veterinary medicine. *Sci Rep*, 6(1): 39235.
 120. Yin, H., Li, J., Huang, H., Wang, Y., Qian, X., Ren, J., Xue, F., Dai, J. and Tang, F. (2021) Microencapsulated phages show prolonged stability in gastrointestinal environments and high therapeutic efficiency to treat *Escherichia coli* O157:H7

- infection. *Vet Res*, 52(1): 118.
121. Ramirez, K., Cazarez-Montoya, C., López-Moreno, H. and Campo, N. (2018) Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7: stability and potential allergenicity study. *PLoS One*, 13(5): e0195023.
 122. Ackermann (2005) Bacteriophage classification. *Bacteriophages: biology and applications*. 67–89.
 123. Nobrega, F.L., Vlot, M., de Jonge, P.A., Dreesens, L.L., Beaumont, H.J., Lavigne, R., Dutilh, B.E. and Brouns, S.J. (2018) Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol* 16(12): 760–773.
 124. Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., Zhao, H., Gao, Y., Song, J., Lu, R., Sun, C. and Feng, X. (2012) A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*, 7(3): 31698.
 125. Kosznik-Kwaśnicka, K., Stasiłojć, M., Grabowski, Ł., Zdrojewska, K., Węgrzyn, G. and Węgrzyn, A. (2022) Efficacy and safety of phage therapy against *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis estimated by using a battery of in vitro tests and the *Galleria mellonella* animal model. *Microbiol Res*, 261: 127052.
 126. Marashi, S.M.A., Nikkhahi, F., Hamed, D. and Shahbazi, G. (2022) Isolation, characterization and in vitro evaluation of specific bacteriophages targeting extensive drug resistance strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from septic burn wounds. *Infect Chemother*, 54(1): 153–164.
 127. Thanki, A.M., Clavijo, V., Healy, K., Wilkinson, R.C., Sicheritz-Pontén, T., Millard, A.D. and Clokie, M.R.J. (2022) Development of a phage cocktail to target *Salmonella* strains associated with swine. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15(1): 58.
 128. Mateus, L., Costa, L., Silva, Y.J., Pereira, C., Cunha, A. and Almeida, A. (2014) Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquac*, 424–425: 167–173.
 129. Nobrega, F.L., Costa, A.R., Kluskens, L.D. and Azeredo, J. (2015) Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends Microbiol*, 23(4): 185–191.
 130. Tanji, Y., Shimada, T., Yoichi, M., Miyanaga, K., Hori, K. and Unno, H. (2004)

- Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64(2): 270–274.
131. Bai, J., Jeon, B. and Ryu, S. (2019) Effective inhibition of *Salmonella* Typhimurium in fresh produce by a phage cocktail targeting multiple host receptors. *Food Microbiol*, 77: 52–60.
132. Piras, F., Fois, F., Mazza, R., Putzolu, M., Delogu, M.L., Lochi, P.G., Pani, S.P. and Mazzette, R. (2016) Bacteriophages with potential to inactivate *Salmonella* Typhimurium: use of single phage suspensions and phage cocktails. *Virus Res*, 220: 179–192.
133. Leung, C.Y.J. and Weitz, J.S. (2017) Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. *J Theor Biol*, 429: 241-252.
134. Loponte, R., Pagnini, U., Iovane, G. and Pisanelli, G. (2021) Phage therapy in Veterinary Medicine. *Antibiotics (Basel)*, 10(4).
135. Penziner, S., Schooley, R.T. and Pride, D.T. (2021) Animal Models of Phage Therapy. *Frontiers in Microbiology*, 12.
136. Estrada Bonilla, B., Costa, A.R., van den Berg, D.F., van Rossum, T., Hagedoorn, S., Walinga, H., Xiao, M., Song, W., Haas, P.-J., Nobrega, F.L. and Brouns, S.J.J. (2021) Genomic characterization of four novel bacteriophages infecting the clinical pathogen *Klebsiella pneumoniae*. *DNA Research*, 28(4).



ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารผงสำเร็จรูป Tryptic Soy Broth (TSB) ประกอบด้วย

Tryptone	17.00 กรัม
Soya peptone	3.00 กรัม
Sodium chloride	5.00 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.50 กรัม
Dextrose (Glucose)	2.50 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร
pH	7.3±0.2

ชั่ง TSB 30.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ประกอบด้วย

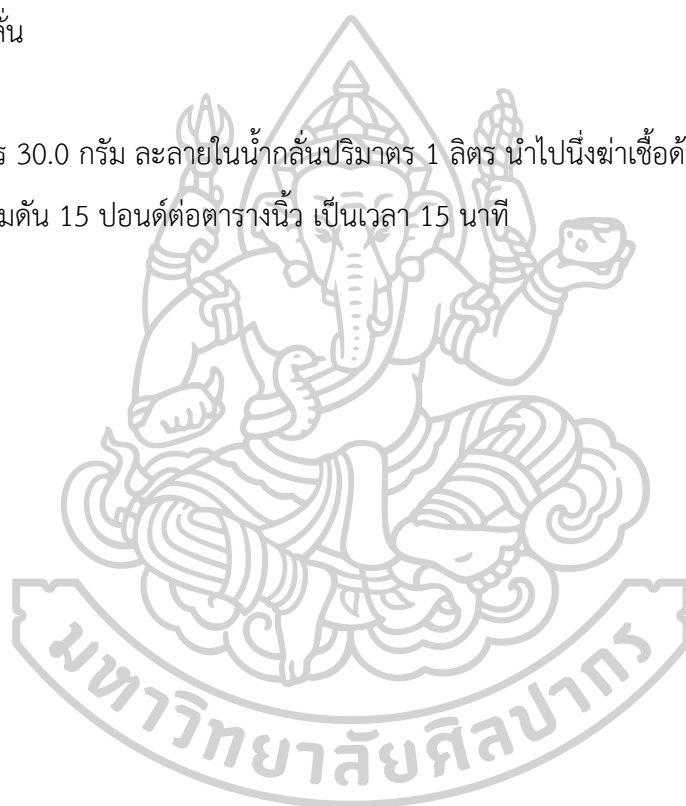
Tryptone	17.00 กรัม
Soya peptone	3.00 กรัม
Sodium chloride	5.00 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.50 กรัม
Dextrose (Glucose)	2.50 กรัม
Agar	15.00 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร
pH	7.3±0.2

ชั่ง TSA 30.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร Molten Agar (0.45% Agar) ประกอบด้วย

Tryptone	17.00 กรัม
Soya peptone	3.00 กรัม
Sodium chloride	5.00 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.50 กรัม
Dextrose (Glucose)	2.50 กรัม
Agar	4.50 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร
pH	7.3±0.2

ชั่งอาหาร 30.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. SM buffer ประกอบด้วย

Sodium chloride	5.80 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.00 กรัม
Tris-HCl 1 โมลาร์ pH 7.5	50 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris Hydrochloride (Tris-HCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่มี pH 7.5

ชั่ง Tris base ปริมาณ 121.1 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9% w/v (NaCl)

ชั่ง NaCl ปริมาณ 9.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 34 มิลลิโมลาร์

ชั่ง NaCl ปริมาณ 0.99 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 400 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่ง MgCl₂ ปริมาณ 20.3 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. 10% ของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)

ชั่ง SDS ปริมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน (อาจให้ความร้อนเพื่อละลายได้ดีขึ้น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

7. กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก (EDTA) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มี pH 8.0

ชั่ง EDTA ปริมาณ 93.05 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 25:24:1

ปิเปต phenol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับ Chloroform ปริมาตร 24 มิลลิลิตร และ Isoamyl alcohol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา

9. สารละลายโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ที่มี pH 5.2

ชั่ง CH_3COONa ปริมาณ 102.0 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 150 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.2 ด้วยกรดอะซิติก (glacial acetic acid) ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี pH 6.8

ชั่ง KH_2PO_4 ปริมาณ 6.8 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. สารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 32 มิลลิโมลาร์

ปิเปต HCl ความเข้มข้น 37% ปริมาตร 1.32 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. สารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ปิเปต HCl ความเข้มข้น 37% ปริมาตร 3.47 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ภัทรพร ศรีประสงค์
วัน เดือน ปี เกิด	8 พฤศจิกายน 2537
สถานที่เกิด	นครปฐม
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2560 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร พ.ศ.2565 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	30/1 หมู่ 2 ตำบลนครปฐม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000
ผลงานตีพิมพ์	Sriprasong, P. and Nasanit, R. (2021). Selection and characterization of bacteriophages specific to Salmonella, pathogenic bacteria in swine., pp. 77. In Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference 2021. 25 Nov 2021, Virtual Conference, Bangkok, Thailand. Sriprasong, P., Imklin, N., Nasanit, R. (2022). "Selection and characterization of bacteriophages specific to Salmonella Choleraesuis in swine". Veterinary World (In press). Imklin, N., Sriprasong, P., Phuttapatimok, S., Kaminsonsakul, T., Woonwong, Y., Pichai Jirawattanapong, P., Lekcharoensuk, P., Thanantong, N., Nasanit, R. (2022). "In vivo assessment of bacteriophages specific to multidrug resistant Escherichia coli on fecal bacterial counts and microbiome in nursery pigs". Journal in Veterinary Science. 151: 138-148.

Imklin, N., Sriprasong, P., Thanantong, N., Lekcharoensuk, P. and Nasanit, R. (2022). “Characterization and complete genome analysis of a novel Escherichia phage, vB_EcoM-RPN242.” Archives of virology. 167: 1675-1679.

เดชภณ ทรงผาสุข, ปฎิญา ปะทีเก, นภาพัญญ์ อิ่มกลิ่น, ภัทรพร ศรีประสงค์, รุจิกาญจน์ นาสนิท, ยลยง วุ้ณวงษ์ และสมชัย สัจจาพิทักษ์. (2564). “การศึกษาเบื้องต้นของการใช้แบคทีริโอเฟจเพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโคไลบาซิลโลซิสในทางเดินอาหารสุกร” การประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 18 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน ไทย. 8 ธันวาคม 2564 - 9 ธันวาคม 2564.: 195-203.

